

**UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAU VON
FIBRINOGEN UND FIBRIN MIT
LEUKOZYTEN-ELASTASE**

Katharina Petri

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. J. Zander

UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAU VON FIBRINOGEN UND FIBRIN MIT
LEUKOZYTEN - ELASTASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katharina Petri
aus
München

- 1980 -

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Graeff

Mitberichterstatter: Prof.Dr.J.Zander

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.4.1980



Für Eberhard und Nico,
für Ursula und Vico

INHALT

Seite

<u>A. EINLEITUNG</u>	1
<u>B. MATERIAL und METHODEN</u>	4
1. Substanzen	4
2. Methoden	6
3. Versuchsansätze	7
3.1. Abbau von Fibrinogen	7
3.2. Weiterabbau von Plasmin-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten mit LE (Leukozyten-Elastase)	7
3.3. Abbau von quervernetztem Fibrin	8
3.4. Weiterabbau von Plasmin-induzierten Spaltprodukten aus quervernetztem Fibrin mit LE	9
3.5. Gerinnbarkeit von LE-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten	9
3.6. Abbau von kalteunlöslichem Globulin	10
3.7. Untersuchungen zur Inhibition von LE	10
<u>C. ERGEBNISSE</u>	11
1. Abbau von Fibrinogen	11
2. Weiterabbau von Plasmin-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten mit LE	14
3. Abbau von quervernetztem Fibrin	16
4. Weiterabbau von Plasmin-induzierten Spaltprodukten aus quervernetztem Fibrin mit LE	19
5. Gerinnbarkeit von LE-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten	20
6. Abbau von kalteunlöslichem Globulin	21
7. Untersuchungen zur Inhibition von LE	22
<u>D. DISKUSSION</u>	23
1. Abbau von quervernetztem Fibrin	23
2. Abbau von Fibrinogen	25
3. Klinische Aspekte	32
<u>E. ZUSAMMENFASSUNG</u>	36
<u>F. LITERATUR</u>	37

ABKÜRZUNGEN

α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
α_2 -M	α_2 -Makroglobulin
CIG	Kälteunlösliches Globulin
EACA	Epsilon-Aminocaprinsäure
E/S	Enzym/Substrat
F'en	Fibrinogen
FPA	Fibrinopeptid A
FPB	Fibrinopeptid B
FSP	Fibrin(ogen)-Spaltprodukte
LE	Leukozyten-Elastase
MG	Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylgel-Elektrophorese
PMN _s	Polymorphkernige Leukozyten
SBI	Sojabohnen-Inhibitor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SK	Streptokinase
XL-Fibrin	Quervernetztes Fibrin

A. EINLEITUNG

Das Interesse an den neutralen Enzymen von menschlichen neutrophilen polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) wurde durch die Entdeckung gefördert, daß diese die Fähigkeit besitzen, bei neutralem pH-Wert Gewebestrukturen wie elastische Fasern, Kollagen und Knorpelsubstanz zu zerstören¹, sowie durch die wichtige Rolle von PMNs bei der Arthus-Vasculitis². So wurden neben der Gruppe der chymotrypsinartigen neutralen Proteasen (Kathepsin G) und den Kollagenasen drei neutrale Proteasen mit elastolytischer Aktivität aus neutrophilen PMNs isoliert und charakterisiert, welche sich nur geringfügig in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden^{rev 1,3,4,5}. Es handelt sich um kationische Serin-Proteasen, deren mittleres Molekulargewicht mit ca. 27.000^{7,5} bzw. ca. 34.000^{3,4} angegeben wird. Da sie identische Aktivität gegenüber Elastase-Substraten zeigen, bzw. sich die Gruppe der Elastasen als Isoenzyme elektrophoretisch getrennt darstellen^{5,7}, soll hier, wie heute bei den meisten Autoren, nur von einer einzigen Leukozyten-Elastase (LE) gesprochen werden.

Die LE wird lokalisiert in den zytoplasmatischen azurophilen Granula von Granulozyten und von Zellen der frühen myelopoetischen Reihe^{1,7}. Mit fortschreitender Zellreifung nimmt der Gehalt der Granula an Elastase ab^{8,9}. PMNs werden u.a. durch spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe und Immun-Komplexe, von degranulierenden PMNs, von Mikroorganismen und Endotoxin zum Teil direkt, zum Teil über die Aktivierung von Komplementfaktoren chemotaktisch angezogen^{rev 2}. Danach kommt es zur Phagozytose opsonisierter Partikel, z.B. Mikroorganismen^{6,10} oder Fibrin¹¹ und praktisch gleichzeitig zur normalerweise überwiegend intrazellulären Degranulation von LE und anderen proteolytischen Enzymen^{2,12} (intrazelluläre Proteolyse). Vor allem unter pathologischen Bedingungen (z.B. Zelltod) dagegen können größere Mengen der Elastase auch in den Extra-

zellulär-Raum freigesetzt werden, was die Zerstörung von Plasmaproteinen und Gewebezellen zur Folge haben kann^{2,42} (extrazelluläre Proteolyse). Leukozyten-Elastase kann ferner auch aktiv sezerniert werden⁴³, wodurch ihr besondere Bedeutung zukommt.

Zur Hemmung der extrazellulären freien LE im Plasma dienen in vivo vor allem α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) und α_2 -Makroglobulin (α_2 -M)⁴⁴. Die Elastase wird von diesen Plasma-Protease-Inhibitoren komplexartig gebunden. Nach dem Transfer von α_1 -Antitrypsin auf freies α_2 -Makroglobulin wird sie, hauptsächlich an letzteres gebunden, wahrscheinlich über das RES, eliminiert (Halbwertszeit in der Zirkulation: LE-Komplex mit α_1 -AT: ca. 1 h, mit α_2 -M: ca. 12 min.). In Normalplasma konnten LE-Inhibitor-Komplexe nachgewiesen werden, während freie, aktive LE neben gesättigten Komplexen zumeist unter pathologischen Bedingungen gefunden wurde⁴⁴.

Als lokal wirksame Schutzfaktoren gegen die proteolytische Wirkung der freien LE werden vor allem niedermolekulare, säurestabile Protease-Inhibitoren angegeben, die aus menschlichem Seminalplasma (HUSI-I)⁴⁵ bzw. Bronchialsekret⁴⁶ isoliert wurden. Derartige Inhibitoren kommen in allen mukösen Sekreten vor und werden lokal von Epithelzellen synthetisiert.

Intrazellulär scheint die LE durch einen Inhibitor gehemmt zu werden, der im löslichen granulafreien Überstand nach Zentrifugation rupturierter neutraler Granulozyten gefunden wurde⁴⁷. Möglicherweise ist auch der Granulozytenkern Sitz des intrazellulären Inhibitors, der etwa bei Nekrose und Autolyse von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsprozessen freigesetzt werden kann⁴⁷.

Die Fähigkeit von PMN-Leukozyten zu intrazellulärer sowie zu extrazellulärer lokaler und generalisierter Fibrinolyse^{11,18} führte zur weiteren Untersuchung ihrer neutralen Proteasen . Es wurde der Abbau von Fibrinogen sowie die Rolle der Proteasen in der Gerinnung untersucht, wobei die noch undifferenzierten, neutralen Proteasen aus PMNs bzw. Elastase als Enzym verwendet wurden^{19,20,21}. Wir führten unsere Versuche mit hochgereinigter Leukozyten-Elastase durch. Da sie offenbar die Komponente mit der stärksten fibrinolytischen Wirkung innerhalb dieser Proteasen darstellt^{21,24}, waren prinzipielle Unterschiede nicht zu erwarten.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zusätzlich die proteolytische Wirkung der LE auf Gerinnsel aus quervernetztem Fibrin zu untersuchen, sowie ihre Spaltspezifität gegenüber Fibrinogen und Fibrin genauer zu charakterisieren, wobei die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) als geeignete Methode erschien²⁵. Dabei dienten die bekannten, durch Plasmin entstandenen Fibrin(ogen)-Spaltprodukte als Vergleich^{26,27,28}. Deshalb wurde eine analoge Benennung der LE-induzierten Abbauprodukte gewählt. Auch gab das Verhalten der FSP_{LE} in der Thrombin-katalysierten Gerinnung über die Spaltspezifität mehr Aufschluß. Schließlich wurde in einem weiteren Abschnitt die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Pathophysiologie behandelt.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Substanzen

1.1. Fibrinogen (F'en):

1 ml F'en (Kabi) (= ca. 10 mg) + 19 ml Tris Puffer, pH 7,4,
c = 500 µg/ml; enthält CIG

1.2. Leukozyten-Elastase (LE): (erhalten von Dr. H. Schiessler)

a) 1 mg LE gelöst in 10 ml Tris-Puffer, pH 7,4

c = 100 µg/ml

b) 2 mg LE gelöst in 1 ml Tris-Puffer, pH 7,4

c = 2 mg/ml

1.3. Plasmin:

Plasmin (Coatest Fa. Kabi): 3 CE gelöst in 10 ml Coatest
Puffer (Tris)pH 7,4

c = 0,3 E/ml

1.4. Streptokinase (SK):

Test Streptokinase (Behringwerke): 5000 E/Fläschchen gelöst
in 2 ml aqua dest.

c = 2500 E/ml

1.5. Aprotinin:

Trasylol (Bayer): 500 000 KIE/50 ml

c = 1000 E/100 µl

1.6. Thrombin:

Test Thrombin (Rind) (Behringwerke): 60 NIH E/Fläschchen
gelöst in 2 ml aqua dest

c = 30 NIH E/ml

1.7. Elastase-Inhibitoren:

a) Bowman-Birk-Inhibitor aus Sojabohnen (SBJ) ^{zit. 33}
(erhalten von Prof. Fritz)

1 mg gelöst in 10 ml Tris-Puffer, pH 7,4

c = 100 µg/ml

b) Eglin (von Frau Dr. U Seemüller)³²

0,5 mg gelöst in 5 ml Tris-Puffer, pH 7,4

c = 100 µg/ml

1.8. Tris-Puffer, pH 7,4:

0,05 M Tris - hydroxymethyl - aminomethan (Tris),

0,116 M NaCl, 0,0129 M tri-Natrium-Citrat,

enthält 6,05 g Tris, 6,76 g NaCl und 3,8g tri-Natrium-

Citrat x 2H₂O im Liter, wird mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

1.9. Weitere Reagenzien:

a) Harnstoff pa. (Merck)

b) Natrium-Dodecylsulfat p.a. (Serva)(abgekürzt: SDS)

c) Epsilon-Aminocapronsäure, puriss. (Roth)(abgekürzt:EACA)

2. Methoden

2.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese:(SDS-PAGE)

Zur Untersuchung der Versuchsansätze wurde die SDS-PAGE nach Weber und Osborn (1973)²⁵ angewendet. Hierbei werden die Proteine, welche gemäß ihrem Molekulargewicht unterschiedliche Laufgeschwindigkeit im Gel haben, in einzelne Banden aufgetrennt. So können die Molekulargewichte anhand von Referenzen bestimmt werden und unterschiedliche Bandenmuster verglichen werden. Durch Reduktion mit Mercaptoäthanol kann zusätzlich eine Aufspaltung der Disulfidbrücken, die die Ketten zusammenhalten, erreicht werden, so daß auch die Untereinheiten (Polypeptidketten) der Proteine aufgetrennt werden können. Nichtreduzierte Proben werden in 5 % bzw. 3,5 %igem Gel getrennt (12 h), reduzierte Proben in 7,5 %igem Gel (8 h).

2.2. Bestimmung der Thrombinzeit:

erfolgt mit Koagulometer nach Schnitger und Groß.

3. Versuchsansätze:

3.1. Abbau von Fibrinogen

Fibrinogenabbau mit Leukozytenelastase (LE):

1. 1 ml F'en Kabi (0,5 mg) + 20 μ l LE (2 μ g): 10 Ansätze
Enzym-Substratverhältnis E/S = 1:250
inkubiert bei 37°C,
gestoppt mit Harnstoff (gesättigt) + SDS (~ 1 mg) nach
5, 10, 20, 40, 60 Min. und 2, 4, 20, 48 und 96 Stunden
2. 1 ml F'en Kabi (0,5 mg) + 10 μ l LE (20 μ g):
E/S = 1:25
inkubiert bei 37°C: 5', 10', 20', 60', 2 h, 20 h
gestoppt wie oben

Fibrinogenabbau mit Plasmin:

1 ml F'en Kabi (0,5 mg) + 100 μ l Plasmin Kabi (0,03 E)
inkubiert bei 37°C
gestoppt mit 100 μ l Trasylol (1000 E) nach 2', 10', 20',
40', 60', 2 h

3.2.: Weiterabbau von plasmininduzierten Fibrinogenspaltprodukten mit LE

F'enabbau durch Plasmin (Streptokinaseaktiviert):

1 ml F'en Kabi (10 mg) + 40 μ l SK (100 E): 2 Ansätze
inkubiert bei 37°C
gestoppt mit 100 μ l Trasylol (1000 E) nach 20' und 2 h
Verdünnung beider Ansätze mit je
9 ml Tris/NaCl/Citrat-Puffer, pH 7,4
Endkonzentration c = 1 mg FSP/ml

Weiterabbau obiger FSP mit LE (E/S = 1:250)

20 ' - FSP = Fibrinogenabbau durch Plasmin nach 20'
2 h - FSP = Fibrinogenabbau durch Plasmin nach 2 h
0,5 ml 20' - FSP (~ 500 μ g FSP) + 20 μ l LE (2 μ g)
0,5 ml 2 h - FSP (~ 500 μ g FSP) + 20 μ l LE (2 μ g)

inkubiert bei 37°C

jeweils gestoppt mit Urea + SDS nach 5', 30', 60',
2 h, 4 h, 24 h

3.3: Abbau von quervernetztem Fibrin (XL-Fibrin)

Herstellung des quervernetzten Fibrin-Clots:

2 ml F'gen Kabi (~ 20 mg)

+ 100 µl CaCl₂ (= 5,5 mg) + 100 µl Thrombin (= 3 NIH E)

2 h inkubiert bei 37°C: Gerinnungsbildung mit Querver-
netzung

Clot in 10 Teile geteilt zu je 2 mg Fibrin

Abbau durch Plasmin mit SK:

~ 2 mg XL-Fibrin + 500 µl Tris-Puffer + 900 µl NaCl +
10 µl SK (25 E)

inkubiert bei 37°C

gestoppt mit 100 µl Trasylol (1000 E) nach 10', 40',
60', 2 h, 2 1/2 h, 20 h;

10'- bis 2 1/2 h-Wert: Clotrest in Urea gelöst

Abbau durch LE (E/S = 1:20 bzw. 1:10):

2 mg XL-Fibrin (bzw. 1 mg) + 500 µl Tris-Puffer + 900 µl
NaCl

+ 50 µl LE (100 µg)

inkubiert bei 37°C

gestoppt mit Urea + SDS nach

10', 60', 2 h, 20 h

3.4.: Weiterabbau von plasmininduzierten FSP aus XL-Fibrin mit
Herstellung von Abbaufragment Doppel-D: LE

2 ml F'en Kabi (20 mg)
+ 150 μ l CaCl_2 (6,3 mg) + 100 μ l Thrombin (3 NIH E)
20' inkubiert bei 37°C: Gerinnungsbildung mit Querver-
netzung
50 μ l SK (125 E) zum Clot zugesetzt,
weiter inkubiert bis zur vollständigen Lösung (ca. 10 h)
nicht gestoppt

Weiterabbau mit LE: (LE/FSP = 1:90)

0,1 ml Doppel-D ($\sim$ 0,9 mg FSP, davon $\sim$ 0,6 mg D-D)
+ 100 μ l CaCl_2 ($\sim$ 5,5 mg) (zur Stabilisierung)
+ 100 μ l LE (10 μ g) (bzw. 100 μ l Saline bei der Kontrolle)
20 h inkubiert bei 37°C
gestoppt mit 20 μ l Trasylol (200 E)
+ 200 μ l Bowman-Birk-Inhibitor + Harnstoff + SDS

3.5.: Gerinnbarkeit von LE-induzierten FSP (E/S = 1:50)

Ansatz A:

500 μ l F'en Kabi (250 μ g) + 50 μ l LE (5 μ g) (bzw. 50 μ l
Saline für Ref.): 12 Ansätze
inkubiert bei 37°C
+ 100 μ l Thrombin (3 NIH E) je Ansatz
Bestimmung der Thrombinzeit (Gerinnung) im Koagulometer
nach Schnitger und Groß nach
5', 7,5', 10', 15', 30', jeweils Doppelbestimmung
15'- und 30'-Werte mit Platinöse untersucht

Ansatz B:

500 μ l F'gen Kabi ($\sim$ 250 μ g)
+ 50 μ l LE (5 μ g) (bzw. 50 μ l Saline für Referenz):
6 Ansätze zu 600 μ l
inkubiert bei 37°C
gestoppt nach 2', 5', 7,5', 10', 30' mit je 50 μ l
Bowman-Birk-Inhibitor (5 μ g)

Thrombinzeit (Schnitger + Groß):

je 300 μ l Ansatz B ($\sim$ 125 μ g FSP)
+ 100 μ l Thrombin (0,6 E) (bzw. 0,3 E)
Thrombinzeit der 2', 5', 7,5'-LE-FSP und der LE-freien
Kontrolle.

3.6 Abbau von kälteunlöslichem Globulin (CIG)

CIG ist neben Fibrinogen im Reagenz Fibrinogen
Kabi® enthalten. Wir verwendeten den Versuchs-
ansatz 3.1.

3.7 Untersuchungen zur Inhibition der LE

500 μ l F'en Kabi ($\sim$ 250 μ g)
+ 20 μ l LE (2 μ g)
E/S = 1:125
inkubiert bei 37°C
gestoppt nach 60 Min. mit Urea + SDS für den Leerwert

Vor der Zugabe von LE wurden folgende Inhibitoren
zugesetzt:

Urea + SDS: Harnstoff bis zur Sättigung sowie ca. 1 mg
SDS

Trasylol: 50 μ l (500 E)

EACA: 6 μ g

Sojabohnen-Inhibitor: 20 μ l (2 μ g) bzw. 80 μ l (8 μ g)

Eglin:³² 40 μ l Eglin (4 μ g); dieser Ansatz wurde nach
60 Minuten nicht gestoppt.

C. ERGEBNISSE

1. Abbau von Fibrinogen

1.1. Nicht reduzierte Proben (Abb. 1a und 1 b)

Beim Abbau von Fibrinogen (F'en) durch Plasmin entstehen die bekannten Fragmente X, Y, D und E (Abb. 1a und Tab. 1). X wird zu Y und D gespalten, und Y zu D und E²⁶.

Durch Einwirkung von Leukozyten-Elastase (LE) auf Fibrinogen in einem Enzym/Substrat Verhältnis (E/S) von 1:250 (Abb. 1a) bei 37° ist nach 5 Minuten ein Fragment (X_{LE}) entstanden, das mit einem MG von ca. 250.000 bereits wesentlich kleiner ist als Fibrinogen (343'000). X_{LE} nimmt weiter kontinuierlich ab, erreicht nach 24 Std. ein MG von ca. 200.000 und liegt damit deutlich unter dem durch Plasmin entstandenen späten X-Fragment mit einem MG von 248.000 (MG aller Plasmin-induzierten Spaltprodukte: Pizzo^{24,28}). Bei der zwischen 5' und 40' gefundenen diffusen Bande im MG-Bereich von ca. 25.000 handelt es sich möglicherweise um den durch Plasmin entstandenen ABC-Peptiden vergleichbare Bruchstücke aus der α -Kette, die noch weiter abgebaut werden. Nach 4 h beginnen sich gleichzeitig zwei neue Fragmente im Y-Bereich abzutrennen, die nach 24 h deutlich ausgeprägt sind (Y_{LE} : ca. 170.000, Y'_{LE} : ca. 140.000). Zu diesem Zeitpunkt findet man auch ein Fragment im D-Bereich (D_{LE}), das mit einem MG von ca. 70.000 ebenfalls kleiner als das durch Plasmin entstandene D-Fragment (100-80.000) ist. Ein E-Fragment wird nicht gefunden.

Bei 10-fachen Enzymkonzentrationen (Abb. 1b) und sonst gleichen Bedingungen ist der Abbauzustand, in dem X_{LE} , Y_{LE} , Y'_{LE} , D_{LE} vorliegen, bereits nach 1 h erreicht. Weitere Inkubation mit LE bewirkt das Auftreten einer dritten Bande im Y-Bereich (Y''_{LE} : ca. 120.000) nach 2 h und den praktisch vollständigen Abbau zu Bruchstücken, deren diffuse Bande (D'_{LE}) im MG-Bereich bei ~50.000 liegt.

Das allmähliche Verblassen der Banden zeigt noch einen weiteren Abbau an, kleinere Fragmente treten jedoch elektrophoretisch nicht mehr in Erscheinung.

1.2 reduzierte Proben (Abb. 2 a und b, Diagramm 1)

A α -Kette

Die A α -Kette wird wie durch Plasmin mit LE am leichtesten gespalten (Abb. 2a). Sie ist bei einem E/S = 1:250 bereits nach 5 Minuten, entsprechend dem hochmolekularen Fragment X_{LE} , nicht mehr nachweisbar. Außer einer sehr diffusen Bande im MG-Bereich von ca. 12.000 werden keine Fragmente sichtbar. Durch Plasmin dagegen entstehen deutlich die Fragmente α' und α'' (Tab. 2).

B β -Kette

Als nächster Schritt erfolgt der Abbau der B β -Kette zu einem Fragment (B' $_{LE}$) mit einem MG von ca. 50.000, das sich nach 20 Minuten zwischen β und γ befindet (Abb. 2 a). Wie aus den entsprechenden Densitometerkurven (Diagramm 1) ersichtlich, erfolgt gleichzeitig eine Verminderung der β -Kette, so daß daraus geschlossen werden kann, daß dieses Fragment tatsächlich aus der β -Kette und nicht aus der α -Kette stammt. β' zeichnet sich durch relativ hohe Beständigkeit aus, so daß es lange Zeit als größtes Kettenfragment vorliegt: bei einem E/S von 1:250 über 24 h, bei 10-facher Enzymkonzentration über 2 h (Abb. 2b, Gel 2). Zu diesem Zeitpunkt findet man daneben bereits eine Bande, die, wie Referenz C zeigt, in Höhe des Plasmin- β'' liegt: β''_{LE} , MG ca. 44.500. Beim Abbau von Fibrinogen durch LE beobachteten wir keinen weiteren Abbau von β''_{LE} in kleinere Fragmente, die Bande verblaßt jedoch allmählich bei weiterer Enzymwirkung.

γ -Kette:

Bei einem E/S von 1:250 treten nach 20 Minuten schwache, nach 1 h fünf ausgeprägte Banden (γ' bis γ^v) auf (Abb. 2a, Gel 5),

deren MGe zwischen ca. 44.000 und 22.000 liegen (Tab. 2). Hier muß es sich um Fragmente aus der γ -Kette handeln, da die α -Kette bereits abgebaut ist, die β -Kette aber erst als $\beta'LE$ vorliegt.

Daraus ergibt sich, daß die γ -Kette im Vergleich zur β -Kette durch LE stärker abgebaut wird als durch Plasmin, bei dem γ'' erst entsteht, wenn β'' bereits vorhanden ist (D-Zustand).

Abb. 1a

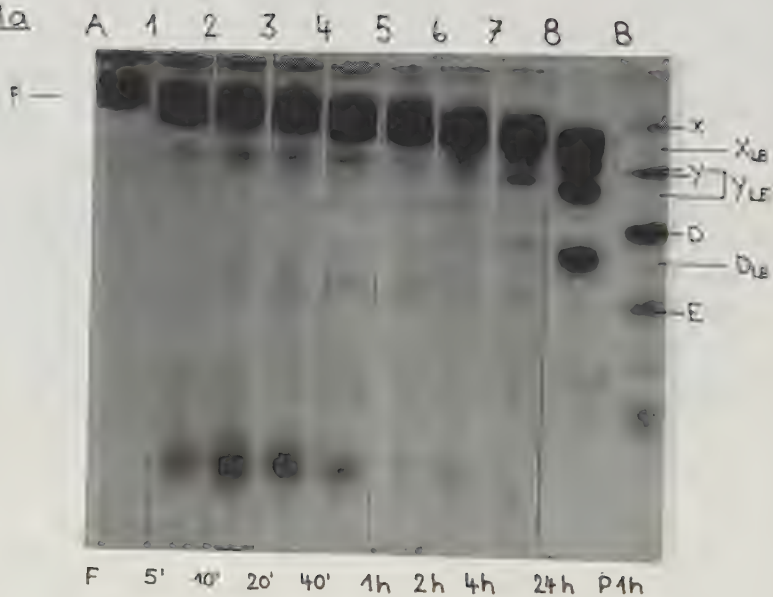


Abb. 2a

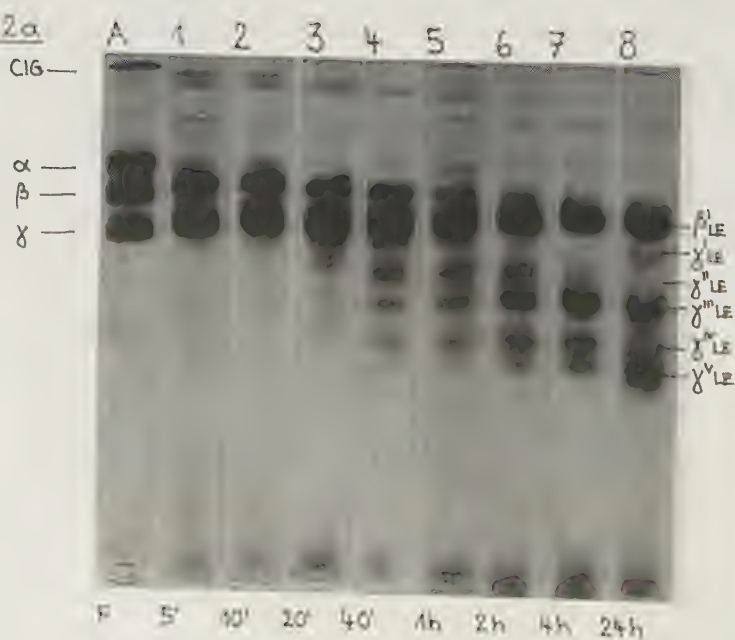


Abb. 1b

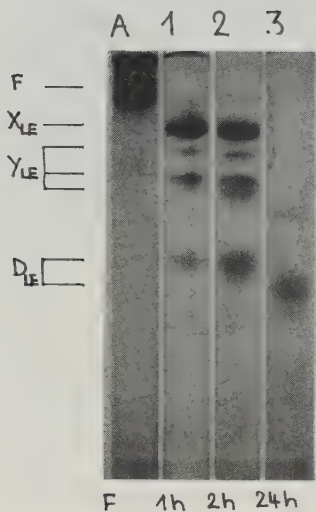


Abb. 2b

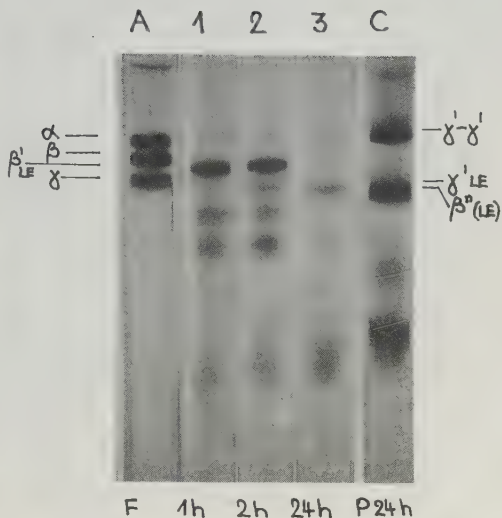


Abb. 1a/2a: SDS-PAGE (1a: nicht reduziert, 5% Gel; 2a: red., 7,5% Gel) von LE-Abbau von Fibrinogen zu den angegebenen Zeiten (1-8). E/S = 1:250. Referenz A: F'gen; B: Plasmin-Abbau von F'gen 1 h.

Abb. 1b/2b: SDS-PAGE (1b: nicht red., 5% Gel; 2b: red., 7,5% Gel) von LE-Abbau von Fibrinogen zu den angegebenen Zeiten (1-3). E/S = 1:25. Referenz A: F'gen Kabi; C: Plasmin-Abbau v. XL-Fibrin (D-D).

Diagramm 1

Densitometrie zu Abb. 2a

A F

1 5'

3 20'

4 40'

5 1h

6 2h

8 24h

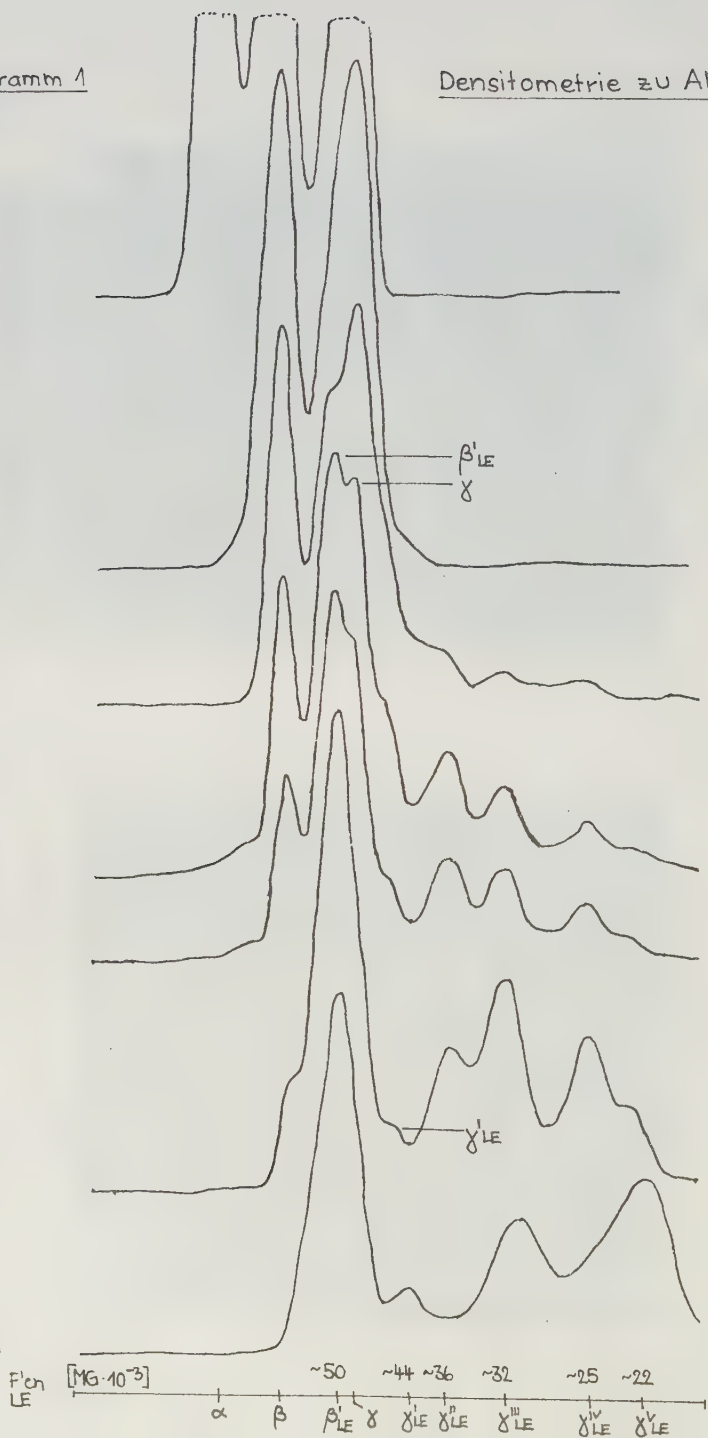


Tabelle 1

MG der Fibrinogen-Spaltprodukte (nicht reduziert)

F'gen	Plasmin-FSP	LE-FSP
343.000	X ₁ 252.000 X ₂ 248.000	X _{LE} ~ 250.000 bis ~ 200.000
	Y 155.000	Y _{LE} ~ 170.000 Y' _{LE} ~ 140.000 Y'' _{LE} ~ 120.000
	D 100.000 bis 80.000	D _{LE} ~ 70.000 bis ~ 50.000
	E 41.000	

Tabelle 2

MG der Fibrinogen-Spaltprodukte (reduziert)

F'gen	Plasmin-FSP	LE-FSP
Aα 70.000	α' 25.000 α'' 15.000	
BB 56.000	β' 52.000 β'' 44.500	β' _{LE} ~ 50.000 β'' _{LE} ~ 44.500
γ 47.500	γ' 42.000 γ'' 37.000 γ''' 25.000	γ' _{LE} ~ 44.000 γ'' _{LE} ~ 36.000 γ''' _{LE} ~ 32.000 γ ^{IV} _{LE} ~ 25.000 γ ^V _{LE} ~ 22.000

2. Weiterabbau von Plasmin-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten mit Leukozyten-Elastase

Auf Fibrinogen-Spaltprodukte (FSP), die wir durch den Abbau von Fibrinogen mit Plasmin nach 20 Minuten bzw. 2 h (Abb. 3/4 Referenz A bzw. B) erhielten, ließen wir LE unterschiedlich lange einwirken (LE/FSP = ca. 1:200). Die Kinetik der Elastase war vermutlich etwas verändert, da der Plasmin-Abbau vorher mit Trasylol gestoppt worden war (Kap. C 7).

2.1. Nicht-reduzierte Proben (Abb. 3a, 3b)

Nach 20 Minuten Plasmin-Abbau liegen die Fragmente X_1 , X_2 , Y, D_1 und schwächer D_2 und E vor (Abb. 3 a). Die Fragmente X und Y werden durch LE praktisch vollständig über zahlreiche Zwischenstufen, die zwischen X und Y, bzw. Y und D wandern, innerhalb von 24 h abgebaut. Es entstehen gleichzeitig zwischen 1 h und 4 h drei ausgeprägte neue Fragmente: eines im Y-Bereich, MG ca. 130.000, das zweite im D-Bereich, MG ca. 70.000 und das dritte unterhalb E, MG ca. 30.000. Da Y und D daneben noch lange erhalten bleiben, entstehen die ersten beiden Fragmente vermutlich einerseits durch Spaltung von X, andererseits durch kontinuierlichen Abbau aller FSP, wie die Zwischenstufen sowie der Abbau der 2 h-FSP (Abb. 3b) zeigen. Da in letzterem D und E, dagegen kaum X und Y vorhanden sind, müssen die neu entstandenen Fragmente hier aus dem Abbau von D bzw. E stammen. Genauer zeigt Abbildung 3a u. 3b die Vorgänge. Nach 24 h Elastase-Abbau der 20-min-FSP und der 2 h-FSP zeigt sich fast das gleiche Bild: praktisch kein X und Y mehr, dagegen die starke Bande unterhalb der Plasmin-D-Linie neben zwei schwächeren, sowie eine bzw. zwei Banden unterhalb von E.

2.2. reduzierte Proben (Abb. 4a u. 4b, Densitometrie 2 u. 3)

A α -Kette:

Während Plasmin- α' durch LE abgebaut wird, bleibt α'' fast vollständig erhalten. Ein Phänomen, was in unseren Versuchen nur in Gegenwart von Trasylol auftrat (siehe Kap. C 7).

B β -Kette:

Da in den Plasmin-FSP keine vollständige β -Kette mehr vorliegt, können wir nur β' und β'' beobachten. Es zeigt sich, daß aus β' erst nach 24 h β'' LE entstanden ist. Dies bleibt in unseren Versuchen stabil (Diagramm 2 u. 3).

γ -Kette:

Die γ -Kette und offenbar auch Plasmin- γ' werden von LE leicht abgebaut. Anhand des Diagramms 2 läßt sich der kontinuierliche Abbau der γ -Kette, das Durchwandern des β'' -Peaks, das Auftreten von γ' LE (MG ca. 42.000) und schließlich die Entstehung von γ''' LE (MG ca. 28.500) verfolgen. Wieder findet man keine γ -Bande mehr, obwohl β' noch stark vorhanden ist (Abb. 4a, Gel 5).

Es zeigt sich auch nach Reduktion die Übereinstimmung des Endzustandes nach Abbau der 20-min-FSP bzw. 2 h-FSP mit LE: bei beiden finden wir β' LE, γ''' LE sowie α'' LE als Endprodukte unseres Versuchs.

Abb. 3a

Abb. 3b

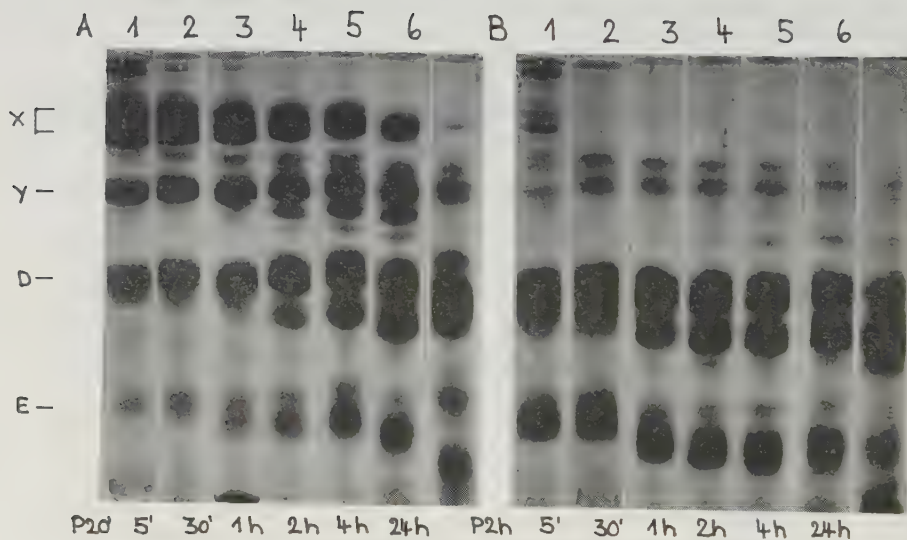


Abb. 4a

Abb. 4b

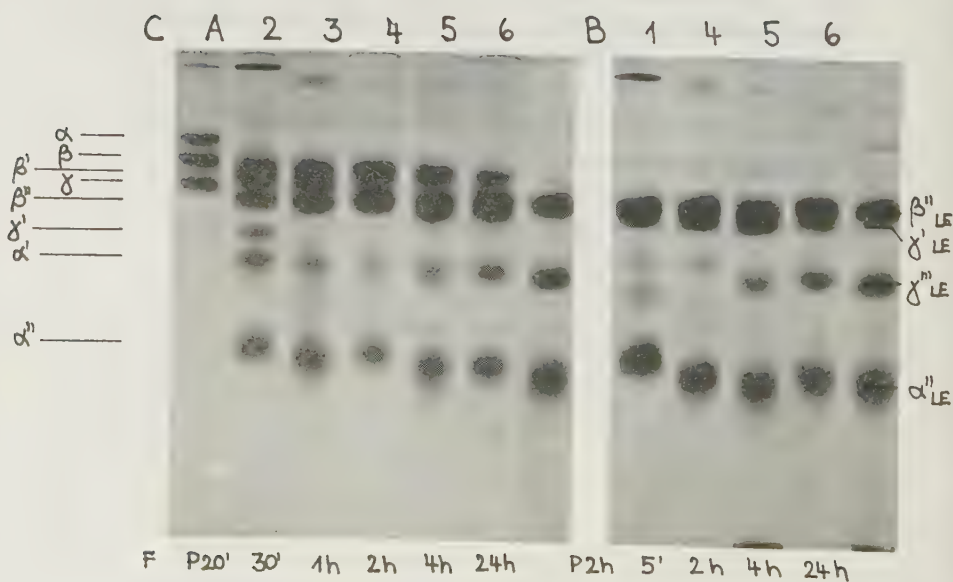


Abb. 3a/b: SDS-PAGE (nicht red., 5% Gel) von LE-Weiterabbau der plasmin-induzierten F'gen-Spaltprodukte zu den angegebenen Zeiten (1-6). Ausgangsmaterial: A: Plasmin-Abbau v. F'gen 20 min.; B: Plasmin-Abbau v. F'gen 2 h.

Abb. 4a/b: SDS-PAGE (red., 7,5% Gel) von LE-Weiterabbau der plasmin-induzierten F'gen-Spaltprodukte zu den angegebenen Zeiten (1-6). Ausgangsmaterial: A: Plasmin-Abbau v. F'gen 20 min.; B: Plasmin-Abbau v. F'gen 2 h. Referenz C: E'gen Kabi.

Diagramm 2, Densitometrie zu Abb. 4a

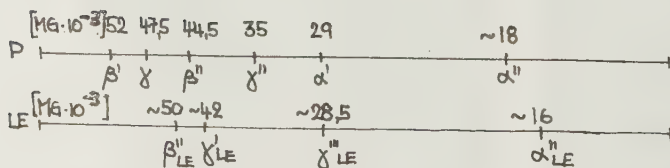
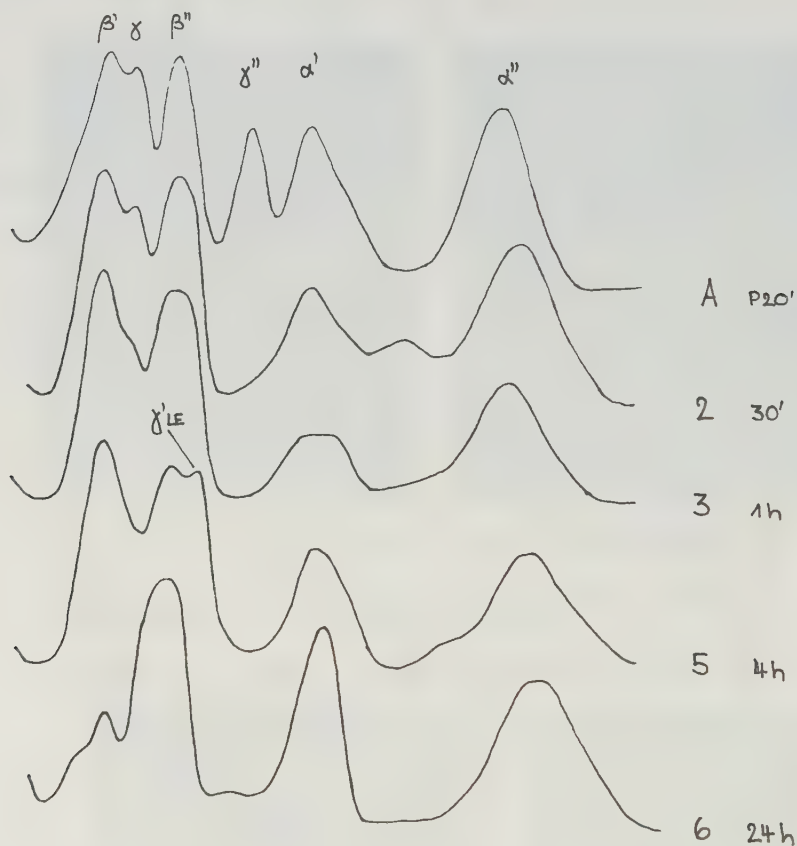
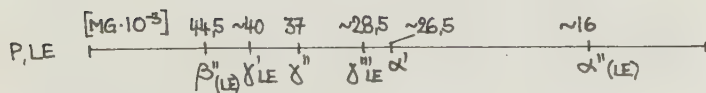
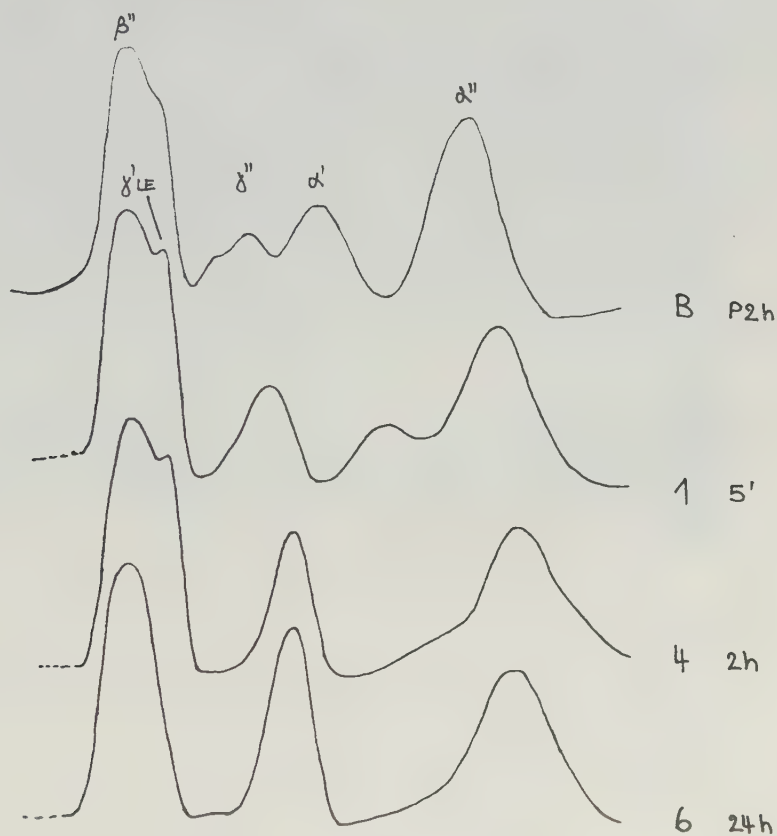


Diagramm 3, Densitometrie zu Abb. 4b



3. Abbau von quervernetztem Fibrin

Ein Gerinnsel aus quervernetztem Fibrin (XL-Fibrin) besteht aus langen Ketten einzelner Fibrin-Monomere, die nach Einwirkung eines Fibrin-stabilisierenden Faktors an den α -Ketten (α -Polymere) und γ -Ketten (γ -Dimere) intermolekular quervernetzt sind³⁰. Ein solches Gerinnsel ist unlöslich. Nach Einwirkung von Leukozyten-Elastase oder Streptokinase (Plasmin) dagegen löst es sich in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer des Enzyms vollständig auf (Stadium der Löslichkeit, später Abbau). Vor seiner Lösung ist das Gerinnsel vorübergehend, obwohl äußerlich noch unverändert, nur in Gegenwart von Harnstoff löslich (Stadium der Dissoziierbarkeit, früher Abbau).

3.1. nicht-reduzierte Proben (Abb. 5 u. Tab.3)

3.1.1. früher Abbau

In diesem Stadium sind die Spaltprodukte des quervernetzten Fibrins in 5 M Harnstoff dissoziierbar. Abb. 5, Gel. 1, zeigt den frühen Abbau von XL-Fibrin durch Plasmin. Bei den

hochmolekularen Fragmenten, deren MG über dem von F'en liegt, handelt es sich um X-Polymere unterschiedlicher Größe. Darunter stellen sich Y-Dimere (Y-Y), Y-D-Fragment und Doppel-D (D-D) durch je eine Bande dar. Fragment E ist schwach sichtbar. Wie Gel 3 zeigt, liegen nach Einwirkung von Leukozyten-Elastase auf XL-Fibrin im Stadium der Dissoziierbarkeit Fragmente vor, die elektrophoretisch den Plasminabbauprodukten ähnlich sind, allerdings weniger distinguert. Im Bereich des Doppel-D (MG $\sim$ 200.000) tritt nur eine schwache Bande auf.

3.1.2. Später Abbau

Die Gerinnsel aus quervernetztem Fibrin konnten durch Elastase bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:200 in 24 h nicht ohne Harnstoff in Lösung gebracht werden (Abb. 5, Gel 3), bei einem E/S von 1:20 dagegen innerhalb dieser Zeit (Gel 4). Bei einem E/S von 1:10 und einem Clot von halber Größe ($\sim$ 1 mg Fibrin) gelang die vollständige Lösung nach 3 h (Gel 5)! Der späte Plasmin-Abbau (Gel 2) zeigt 2 Banden für Doppel-D, 2 Bänder für Reste von nicht-quervernetztem D, und Fragment E. Dagegen findet man im LE-Abbau in diesem Stadium lediglich Bruchstücke, die nur noch ein MG von ca. 90.000 und darunter besitzen (Gel 4 und 5). Eine dem Doppel-D entsprechende Bande tritt nicht mehr auf.

3.2 reduzierte Proben (Abb. 6 u. Tab. 3)

3.2.1 früher Abbau

Im Stadium der Dissoziierbarkeit in Harnstoff zeigt der LE-Abbau eines Gerinnsels aus XL-Fibrin (24 h bei E/S = 1:200) elektrophoretisch große Ähnlichkeit mit dem Plasmin-Abbau (Abb. 6, Gel 1 und 3).

γ - γ -Kette:

In beiden Fällen ist, entsprechend der Polymer-Struktur im nicht-reduzierten Zustand, die γ - γ -Quervernetzungs-Kette zum Teil noch erhalten, zum Teil bereits zu den Fragmenten γ - γ' und γ' - γ' (bzw. γ - γ'_{LE} und γ' - γ'_{LE}) abgebaut. Eine schwache Bande im MG-Bereich von ca. 30.000 stellt unter Umständen ein Fragment von nicht-quervernetzten γ -Ketten dar, möglicherweise aber auch noch quervernetzte Bruchstücke, die beim Abbau von α -Polymeren durch Elastase bzw. Plasmin entstehen²⁷.

α -Kette:

Die α -Kette ist auch bei XL-Fibrin gegen LE und Plasmin sehr labil. Während durch Plasmin α' und α'' entstehen, findet man im LE-Abbau nur eine schwache Bande im α'' -Bereich(α''_{LE}).

β -Kette:

Der Plasmin-Abbau von XL-Fibrin zeigt die Fragmente β und β'' . Abweichend davon findet man im LE-Abbau eine deutliche Bande vom MG ca. 52.000 (β'_{LE}) zwischen der β -Bande und Fragment β''_{LE} .

3.2.2. später Abbau

Nach PAGE des vollständig gelösten Gerinnsels durch Plasmin werden die dem Doppel-D entsprechenden Banden γ' - γ' und β'' neben α -Ketten-Bruchstücken sichtbar (Abb. 6, Gel 2). Im seltenen Abbau-Stadium nach Einwirkung von Elastase dagegen findet man keine quervernetzten γ -Ketten-Fragmente mehr. Neben diffusen Banden im MG-Bereich unter ca. 15.000 stellt sich als einziges deutliches Fragment β''_{LE} dar (Gel 4 und 5). Diesem Befund entspricht der Abbau (im nicht-reduzierten Zustand) zu Fragmenten im D-Bereich und darunter.

Abb. 5

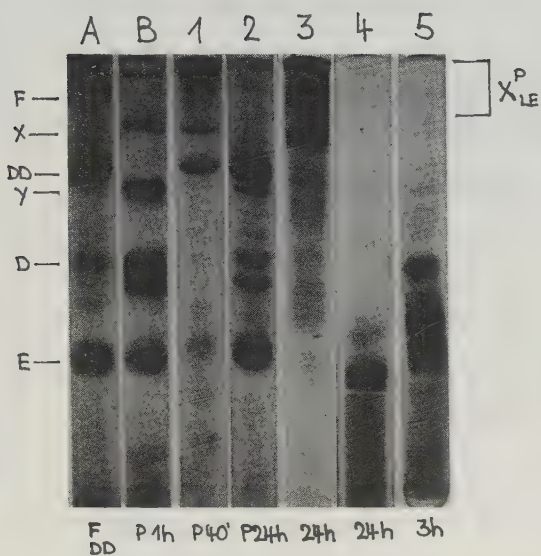


Abb. 7

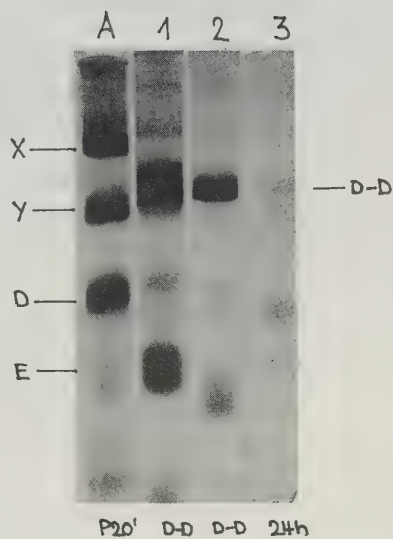


Abb. 6

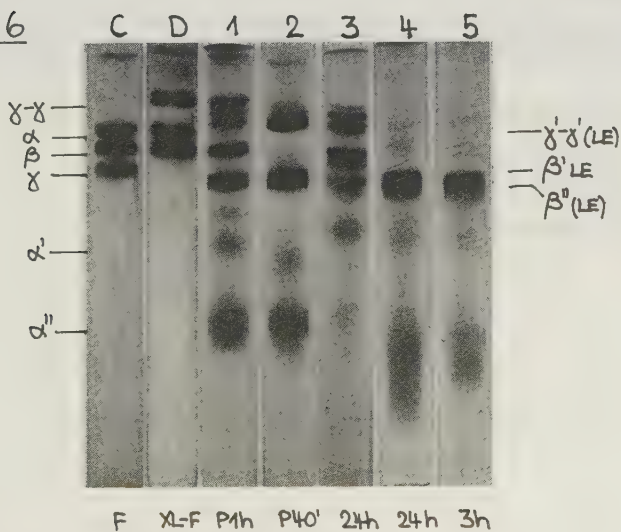


Abb. 5/6: SDS-PAGE (5: nicht red., 5% Gel; 6: red., 7,5% Gel) von Plasmin-Abbau v. XL-Fibrin (1+2), von LE-Abbau v. XL-Fibrin (3-5) zu den angegebenen Zeiten. E/S = 1:200 (3), 1:20 (4), 1:10 (5). Referenz A: F'gen Kabi + Plasmin-Abbau v. XL-Fibrin (D-D); B: Plasmin-Abbau v. F'gen 1 h; C: F'en Kabi; D: XL-Fibrin.

Abb. 7: SDS-PAGE (nicht red., 5% Gel) von Plasmin-Abbau von XL-Fibrin (D-D) (1), 24 h inkubiert mit Saline (2), bzw. LE-Weiterabbau nach 24 h (3).

Tabelle 3

Die Plasmin-induzierten Spaltprodukte aus quervernetztem Fibrin

XL-Fibrin	Plasmin-FSP			
α , β , γ	nicht-red.		red.	
	X ^P (250.000) _h	α'	β	$\gamma\gamma$
	Y-Y 300.000	α'	β	$\gamma\gamma$
	Y-D 250.000	α' α''	β β''	$\gamma\gamma'$
	D-D 200.000	α''	β''	$\gamma'\gamma'$
	E 50.000			

4. Weiterabbau von plasmininduzierten Spaltprodukten aus quervernetztem Fibrin mit LE (Abb. 7)

Einwirkung von LE auf die Spaltprodukte von quervernetztem Fibrin (Doppel-D und E) ($E/S = 1:90$) führte nach 20-stündiger Einwirkung bei 37°C zu einem völligen Abbau von D-D und E, erkennbar daran, daß nach PAGE die charakteristischen Banden von D-D und E nur noch in Spuren (D-D) bzw. nicht mehr (E) vorhanden waren. Als Vergleich diente eine Kontrolle, die analog weiter inkubiert worden war, jedoch in Abwesenheit von LE. Daraus, daß keine neuen Banden auftraten, kann geschlossen werden, daß der Abbau zu kleinen Bruchstücken mit MG 30.000 erfolgte, die bei diesen Bedingungen der PAGE bereits aus dem Gel herausgewandert sein können (Abb. 7).

Unter reduzierten Bedingungen zeigt sich ebenfalls weiterer Abbau der Doppel-D-Komponenten $\chi'-\chi'$, β'' und α'' .

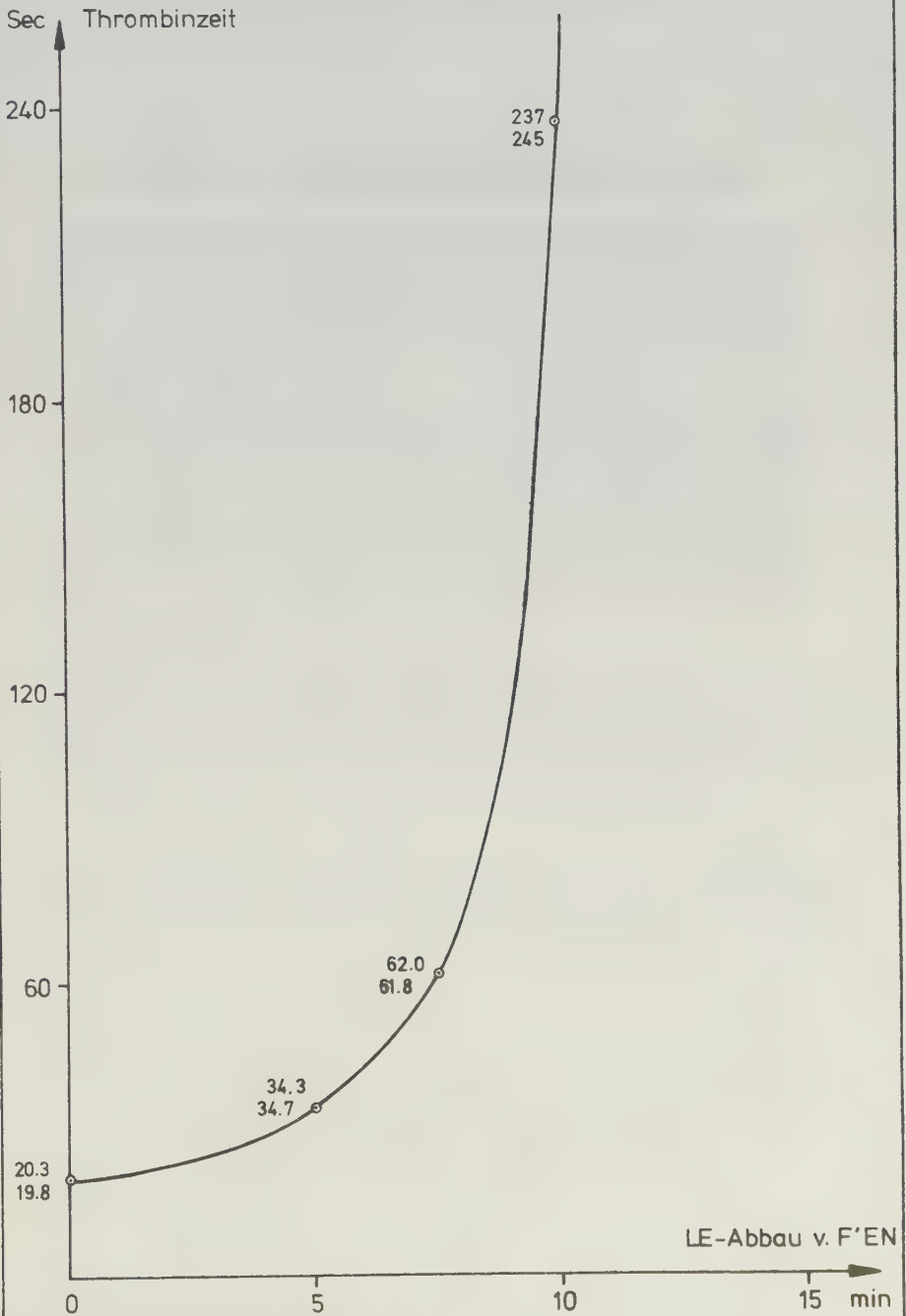
Der Weiterabbau durch LE fand in Gegenwart von Trasylol (zur Stoppung des Plasmin-Abbaues) sowie Calcium (zur Stabilisierung der Fragmente D-D und E vor weiterem Abbau durch Plasmin selbst) statt.

5. Gerinnbarkeit von LE-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukten

Bei der Bestimmung der Thrombinzeit von FSP nach Abbau von Fibrinogen mit LE ($E/S = 1:50$) zeigte das Koagulometer nach Schnitger und Groß eine anfangs nur schwach, nach 5 Minuten jedoch steil ansteigende Verlängerung der Thrombinzeit an, die bereits nach 10 Minuten eine aufgehobene Gerinnbarkeit der LE-Abbaugemische anzeigt. Nach 15 Minuten bzw. nach 30 Minuten konnten mit der Platinöse jedoch noch einzelne Gerinnsel-Fädchen gefunden werden, die schwächere Gerinnung wurde vom Koagulometer jedoch nicht mehr erfaßt.

Wir stellen also fest, daß die Elastase Fibrinogen bereits sehr früh, d.h. zu einem Zeitpunkt, bei dem noch ein großes X_{LE} -Fragment, praktisch aber noch kein Y_{LE} -Fragment vorhanden ist, so verändert, daß es nicht mehr gerinnen kann, obwohl sich die elektrophoretische Beweglichkeit dieses X_{LE} kaum von der des F'en unterscheidet. Hierin liegt ein wesentlicher Unterschied zum Plasminabbau von F'gen, bei dem X zwar verzögert, jedoch noch gut gerinnbar ist und erst Y nicht mehr koaguliert. (s. Graphik)

Gerinnbarkeit v. LE-induzierten FSP



6 . Abbau von kälteunlöslichem Globulin (Abb. 2a)

Kälteunlösliches Globulin (cold insoluble globulin, CIG) besitzt ein MG von $\sim 450\,000$ und besteht aus zwei identischen Untereinheiten von $\sim 220\,000$ ³⁹, die sich nach Reduktion als eine einzige Bande in der PAGE weit über der α -Kette darstellen. Diese Bande verändert sich nach Einwirkung von Plasmin nicht, während sie unter LE-Wirkung rasch verschwindet und offensichtlich durch zwei neue Banden (MG $\sim 150\,000$ und $\sim 140\,000$) ersetzt wird, die bei weiterer Einwirkung noch weiter abgebaut werden. CIG wird also nicht von Plasmin, jedoch von LE abgebaut, und zwar bereits bei geringer Enzym-Konzentration bzw. kurzer Einwirkungsdauer (E/S = 1:250 nach 5').

7. Untersuchungen zur Inhibition der LE (Abb. 8)

Urea + SDS (Gel 6)

Wir stoppten die meisten Versuche mit LE durch Zugabe von Harnstoff und SDS, wodurch die enzymatische Aktivität zuverlässig gehemmt wurde.

Trasylol (Gel 2)

Die Hemmwirkung des Plasmin-(Kallikrein)-Inhibitors Trasylol muß im Sinne einer zeitlichen Verzögerung des Abbaus von Fibrinogen bzw. Fibrin durch LE verstanden werden (unvollständige Hemmung), der sich v.a. am verlangsamten Abbau der α -Kette zeigt. Da der Weiterabbau von plasmininduzierten Fibrinogen-Spaltprodukten mit LE (Kap. 2) in Gegenwart von Trasylol stattfand, kann damit gerechnet werden, daß dieser verlangsamt ablief.

Epsilon-Aminokapronsäure (EACA) (Gel 1)

EACA, welches die Aktivierung von Plasminogen hemmt, hat offenbar ebenfalls auf die LE lediglich eine Hemmwirkung im Sinne einer zeitlichen Verzögerung der Kinetik.

Sojabohnen-Inhibitor (SBI) (Gel 3 und 4)

Der von Bowman und Birk^{zit. 33} aus Sojabohnen isolierte Inhibitor zeigte erst praktisch vollständige Hemmung der LE bei einem Verhältnis SBI/LE von 5:1. Die Aktivität von Plasmin wird dagegen nicht gehemmt.

Eglin (Gel 5)

Der aus Blutegeln isolierte Hemmstoff Eglin³² hemmt auch bei 4-facher Inhibitor-Enzym-Konzentration offenbar die LE nur in geringem Ausmaß, was sich insbesondere an der Verlangsamung des α -Ketten-Abbaues zeigt.

Abb. 8

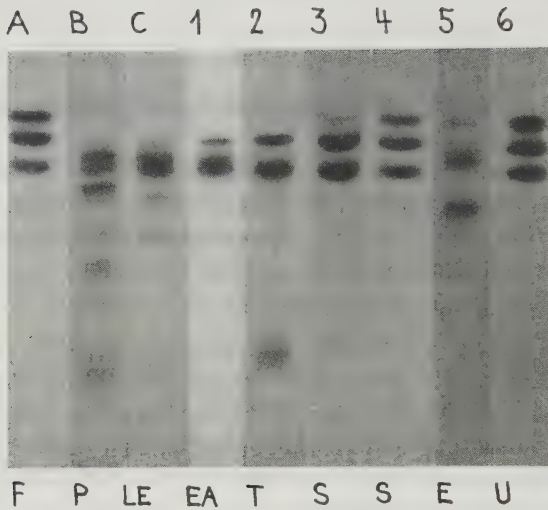


Abb. 8: SDS-PAGE (red. 7,5 % Gel) von LE-Abbau von F'gen, 60 Min., in Gegenwart von Inhibitoren: EACA (1) Trasylol (2), SBI (Gel 3: LE/SBI = 1:1, Gel 4: LE/SBI = 1:4), Eglin (5) (nicht gestoppt), Urea und SDS (6). Referenzen: F'en Kabi (A), Plasmin-Abbau von F'gen 20 Min. (B), LE-Abbau von F'gen 60 Min. (C).

D. DISKUSSION

Der Abbau von Fibrinogen und quervernetztem Fibrin durch Leukozyten-Elastase (LE) verläuft trotz einiger Ähnlichkeiten anders als durch Plasmin und führt zu stärker abgebauten Endprodukten. Auch in ihrer submolekularen Struktur weisen die durch LE entstandenen Fragmente (FSP_{LE}) zum Teil erhebliche Unterschiede zu den plasmin-induzierten Spaltprodukten (FSP) auf, obwohl ihre Molekulargewichte häufig gut übereinstimmen. Dies scheint das unterschiedliche Verhalten in der Gerinnbarkeit und in der antikoagulativen Hemmwirkung früher FSP_{LE} zu bedingen, woraus sich besondere Aspekte für die Pathophysiologie ergeben.

1. Abbau von quervernetztem Fibrin

Die Lösung eines Fibrin-Clots ist nicht nur abhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis (E/S) und der Einwirkungszeit des Enzyms, sondern auch von der Größe sowie der Oberflächenstruktur des Clots, da die Elastase in unseren in-vitro-Versuchen nur von außen über die Oberfläche des Gerinnsels wirksam wird. Da bei einem kleinen Clot die Oberfläche im Verhältnis zur Masse größer ist als bei einem größeren Clot, können kleine Gerinnsel bei sonst gleichen Bedingungen schneller gelöst werden. Auch beschleunigt eine unregelmäßige Oberflächenstruktur eines Clots seine Löslichkeit ebenfalls durch die Oberflächenvergrößerung.

Die Lösung von Gerinnseln aus ca. 1 mg quervernetztem Fibrin (XL-Fibrin) erfolgte durch hochgereinigte Leukozyten-Elastase bei einem E/S von 1:10 innerhalb von 3 Stunden (Stadium der Löslichkeit, später Abbau). Vor seiner Lösung war das Gerinnsel vorübergehend, obwohl äußerlich noch unverändert, nur in Harnstoff löslich (Stadium der Dissozzierbarkeit, früher Abbau). Diese Stadien werden ebenso bei der Lösung

von Fibrin-Gerinnseeln durch Streptokinase bzw. Plasmin beobachtet. Wie die elektrophoretischen Bandenmuster in beiden Stadien zeigen, ergeben sich trotz mancher Ähnlichkeiten wesentliche Unterschiede v.a. in der submolekularen Struktur der durch Plasmin bzw. Elastase entstandenen Fragmente (Abb. 5 und 6).

Die α -Kette wird in beiden Fällen als erste Kette rasch abgebaut, wobei durch LE die vom Plasmin-Abbau bekannten Fragmente α' und α'' nicht in der Deutlichkeit auftreten²⁶ (s. 2.2).

Der Abbau der $\beta\beta$ -Kette verläuft durch Plasmin und LE in unterschiedlicher Weise: LE spaltet die $\beta\beta$ -Kette von XL-Fibrin zu β'_{LE} , das in unseren Versuchen im frühen Abbau-Stadium auftritt. Zu diesem Zeitpunkt liegen in beiden Fällen Polymere von hochmolekularen Fibrin-Fragmenten vor, die in Harnstoff dissoziieren. Dem gegenüber entsteht durch Plasmin β' lediglich beim Abbau der B β -Kette von Fibrinogen, die β -Kette von Fibrin dagegen wird gleich zu β'' gespalten^{26,27}. β'' (bzw. β''_{LE}) liegt im späten Abbaustadium, wenn das Gerinnsel löslich ist, im Plasmin-Abbau und im LE-Abbau vor. β''_{LE} kann im Gegensatz zum Plasmin- β'' weiter abgebaut werden.²⁹

Die γ - γ -Kette, welche durch Faktor XIIIa quervernetzt ist³⁰, wird anfangs durch beide Enzyme in analoger Weise über γ - $\gamma'_{(LE)}$ zu γ - $\gamma'_{(LE)}$ abgebaut. Im weiteren Verlauf jedoch zeigt sich Abbau von γ - $\gamma'_{(LE)}$ zu Kettenbruchstücken vom MG unter 20.000. Plasmin- γ - γ' stellt neben β'' und α'' die submolekularen Komponenten von Doppel-D dar, das in Gegenwart von Calcium neben Fragment E stabil bleibt^{28,29}. Beide Fragmente, das dimere Doppel-D sowie Fibrin-E, werden durch LE demnach

über Fragmente vom MG zwischen ca. 20.000 und 30.000 vollständig abgebaut. Dabei wird, anders als bei Plasmin, der Abbau durch die Anwesenheit von Calcium-Ionen nicht verhindert.³² Somit tritt auch das als Marker für disseminierte intravaskuläre Gerinnung charakteristische Fragment Doppel-D³⁴ im Elastase-Abbau nur vorübergehend als instabiles Zwischenprodukt auf, bevor es vollständig abgebaut wird (Abb. 5, 6 und 7).

2. Abbau von Fibrinogen

Zur weiteren Charakterisierung der von Plasmin abweichenden Spalteigenschaften der LE untersuchten wir ihre Wirkung auf Fibrinogen.

2.1. Die Affinität von Fibrinogen zu LE scheint relativ hoch zu sein, wofür unsere Versuche mit den aus Blutegeln (Eglin) bzw. Sojabohnen (SBJ) isolierten Inhibitoren sprechen.^{32, art. 33} Mit dem Substrat Fibrinogen zeigte Eglin auf LE auch bei 4-facher Konzentration elektrophoretisch nur geringe Hemmwirkung, welche am verlangsamten Abbau der A α -Kette sichtbar wird (vgl. Hemmung mit Trasylol). SBJ hemmte die LE erst bei 5-facher Inhibitor-Konzentration vollständig. Vermutlich wurden andere Ergebnisse, in denen wesentlich stärkere Hemmwirkung der genannten Inhibitoren gezeigt werden konnte, auf Grund der Verwendung eines synthetischen Substrates erzielt.^{32, 33}

2.2. Weiter wurde die proteolytische Wirkung der LE auf Fibrinogen untersucht:

Wie die elektrophoretische Darstellung der FSP_{LE} unter nicht-reduzierten Bedingungen zeigt, finden wir durch LE nicht das bekannte Bandenmuster, welches durch Abbau von Fibrinogen mit Plasmin entsteht (X,Y,D,E)²⁶ (s. Abb. 1a, 1b). Während Fibrinogen mit Plasmin diskontinuierlich (z.T. über eine Spaltung durch alle 3 Ketten hindurch) aufgespalten wird $\rightarrow$ X(dimer) zu Y (dimer) und D (monomer), Y weiter zu D und E $\rightarrow$, verläuft

der Fibrinogen-Abbau durch Elastase weitgehend kontinuierlich, d.h. LE greift an mehr Spaltstellen an als Plasmin: das MG von X_{LE} nimmt allmählich von 340.000 bis ca. 200.000 ab und bleibt noch eine zeitlang stabil, während drei Y_{LE} -Fragmente (MG ca. 170.000 bis 130.000) sowie ein Bruchstück im D-Bereich (D_{LE} , MG ca. 70.000) entstehen. Fragment E wird nicht gefunden. Im weiteren Verlauf findet auch Abbau von D_{LE} statt, der auch hier in Gegenwart von Calcium nur geringfügig verlangsamt ist²². Mit Plasmin dagegen stellen D und E in Gegenwart von Calcium die Endprodukte des Fibrinogen-Abbaues dar²⁹. Auch die Inkubation der Plasmin-induzierten FSP (X, Y, D, E) mit LE zeigt kontinuierlichen Abbau aller Fragmente, auch von D und E (Abb. 3a, 3b). Fragment E, das den dimeren Kern des Fibrin(ogen)moleküls darstellt, muß demnach Spaltstellen für LE besitzen, weshalb vermutlich auch in unseren Versuchen beim reinen LE-Abbau es nicht deutlich auftritt.

Auch durch die submolekulare Struktur der Fibrinogen-Abbauprodukte (PAGE nach Reduktion mit Merkaptoäthanol) fanden wir bestätigt, daß sich die Spaltspezifität der LE von der des Plasmins unterscheidet. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten fanden wir, daß alle drei Ketten, $\alpha\alpha$, B β und γ , rasch durch LE abgebaut werden^{19,20}. Im einzelnen ergaben sich folgende Charakteristika (Abb. 2 a, 2b):

Die $\alpha\alpha$ -Kette wird wie durch Plasmin als erste sehr leicht abgebaut. Dabei treten jedoch die beim Plasminabbau bekannten Kettenbruchstücke α' (MG 25.000) und α'' (15.000)²⁶ aus Fibrinogen nicht auf. Beim Abbau_{LE} von quervernetztem Fibrin werden in diesem Bereich schwache Banden gefunden, die jedoch möglicherweise quervernetzte Bruchstücke von α -Kettenpolymeren darstellen. LE spaltet die α -Kette stärker als Plasmin, wodurch kleinere Bruchstücke entstehen, die elektrophoretisch nur schwer nachweisbar sind. In Gegenwart von Trasylol werden dagegen α' -Banden gefunden (s. auch Weiterabbau von FSP mit LE, Abb. 4). Trasylol zeigt nur schwache Hemmwirkung auf LE

im Sinne einer Verlangsamung der Kinetik, die vermutlich am Abbau der α -Kette am deutlichsten wird, da die Elastase die höchste Affinität zur α -Kette besitzt.

Der Abbau der B β -Kette verläuft ähnlich wie durch Plasmin über β'_{LE} (ca. 50.000) zu β'_{LE} (ca. 45.000), d.h. ca. 50 bzw. 100 Aminosäuren werden von den 447 Aminosäuren (AS) der β -Kette abgespalten²⁶. Dabei sind β'_{LE} und β'_{LE} recht stabile Zwischenprodukte, bevor auch sie weiter abgebaut werden. Wie bereits hervorgehoben, entsteht β'_{LE} durch LE nicht nur aus Fibrinogen, sondern auch aus Fibrin, während β' durch Plasmin nur aus Fibrinogen gespalten wird.

Die γ -Kette wird im Vergleich zur $\beta\beta$ -Kette rascher abgebaut als durch Plasmin und enthält mehr Spaltstellen für LE, wodurch mindestens 4 größere Bruchstücke entstehen. Diese lassen sich bis hinunter zu einer Größe von etwa 20.000 durch PAGE deutlich darstellen. Besonders charakteristisch sind 3 bis 4 Banden (γ' bis γ'^v), die im MG-Bereich zwischen 44. und 22.000 liegen. Bei diesen Fragmenten muß es sich um γ -Kettenfragmente handeln, da zu diesem Zeitpunkt einerseits die α -Kette bereits weiter, andererseits die $\beta\beta$ -Kette erst bis zu β'_{LE} abgebaut ist (Abb. 2a, Gel 4). Auch beim LE-Weiterabbau von plasmininduzierten FSP zeigt sich die Spaltung von Plasmin- γ' und γ'^v bereits, während die β' -Kette noch stabil ist (Abb. 4a, 4b).

Zu diesem Zeitpunkt, zu dem unter reduzierten Bedingungen eine Vielzahl von Banden vorliegt, ist im nicht-reduzierten Abbaugemisch praktisch nur eine breite X_{LE} -Bande sichtbar, die demnach recht heterogener Struktur ist: Sie stellt offenbar Fragmente dar, die sich, durch den kontinuierlichen Abbau mit LE bedingt, in der Länge ihrer γ -Ketten-Fragmente unterscheiden. Die Spaltung der γ -Kette erfolgt durch Plasmin dagegen erst später, d.h. erst bei der Abspaltung von Fragment D.²⁶ Die Heterogenität des Abbaues ist ein Kennzeichen von Enzymen geringerer Spezifität.²⁰

In unseren Versuchen zeigt der Abbau von Fibrinogen und XL-Fibrin mit LE also folgende Besonderheiten gegenüber Plasmin:

β'_{LE} tritt als relativ stabiles Zwischenprodukt aus Fibrinogen und XL-Fibrin auf, was bedeutet, daß die Abspaltung des Fibrinopeptides B (FPB) durch Thrombin an der B β -Kette beim Übergang von Fibrinogen zu XL-Fibrin, und damit die Änderung der Tertiärstruktur des Moleküls, den (B) β -Ketten-Abbau durch LE im Gegensatz zu Plasmin nicht verändert. Ferner bleiben die höhere Spaltbarkeit sowie die höhere Affinität der χ -Kette des Fibrinogens zu LE im Gegensatz zu Plasmin auch nach Quervernetzung mit Faktor XIII erhalten: Die im χ - χ -Dimer vorhandene Quervernetzung stellt nicht wie für Plasmin (in Gegenwart von Calcium) ein Abbauhindernis dar, vielmehr wird es, wie bereits beschrieben, über χ - χ'_{LE} und χ' - χ'_{LE} zu Fragmenten von ca. 15.000 MG und darunter abgebaut (s. Abb. 6 und 7). Vermutlich ließen sich wegen fehlender Beobachtung aller Zwischenstadien nicht alle entstandenen Fragmente nachweisen. Es kann jedoch angenommen werden, daß es zur Spaltung der χ' - χ'_{LE} -Kette (MG 81.000) knapp hinter der Quervernetzungsregion, die sehr nahe dem C-Terminus liegt,³⁰ kommt, so daß nur ein sehr kleines quervernetztes Bruchstück (MG < 10.000), sowie analog zum Fibrinogenabbau zwei χ'_{LE} -Fragmente (MG ~ 37.000) übrigbleiben, welche zu χ'''_{LE} und weiter abgebaut werden (MG ~ 15.000).

Wegen der größeren Anzahl von Spaltstellen, die durch LE im Fibrinogen und quervernetzten Fibrin auftreten, verläuft der Abbau kontinuierlicher und führt zu kleineren Endprodukten als durch Plasmin. Die Endprodukte des Plasmin-Abbaues, die Fragmente D und E aus Fibrinogen, sowie Doppel-D und E aus XL-Fibrin, werden durch LE in analoger Weise weiter gespalten.

2.3. Die Gerinnungsfähigkeit der LE-induzierten Fibrinogen-Abbauprodukte ist wesentlich früher aufgehoben als die der Plasmin-FSP: bereits in einem Stadium, in dem sich elektrophoretisch als einziges Fragment X_{LE} darstellt, bzw. die $A\alpha$ -Kette abgebaut, die $B\beta$ -Kette zu β'_{LE} gespalten, und die γ -Kette noch zum größten Teil vollständig zu sein scheint, ist die Gerinnbarkeit, wie unsere Versuche zeigen, aufgehoben. Dies zeigt sich mit gereinigter LE ebenso, wie bei Verwendung von Leukozyten-Elastasen bzw. Proteasen anderer Herstellungsverfahren^{19,22,23}.

Beim Fibrinogen-Abbau durch Plasmin können demgegenüber erst Fragment Y und D als asymmetrische Moleküle nicht mehr polymerisieren und gerinnen damit nicht mehr³⁴. Es müssen durch LE weniger Aminosäure-Reste abgespalten werden als durch Plasmin, bis die FSP_{LE} ungerinnbar werden²³.

Aus letzteren Versuchen sowie aus dem Weiterabbau von Plasmin-FSP durch LE lassen sich gewisse Schlüsse auf die Lage der LE-Spaltstellen ziehen:

Es kann angenommen werden, daß LE neben der $(B)\beta$ -Kette und der γ -Kette (in Übereinstimmung mit Plasmin) auch die $(A)\alpha$ -Kette vom N-terminalen Ende her spaltet, während letztere durch Plasmin C-terminal abgebaut wird³⁰.

Im Falle der γ -Kette zeigt die elektrophoretische Ähnlichkeit des Abbaues von γ - γ -Dimeren, die C-terminal quervernetzt sind, durch Plasmin und LE analoge Spaltung. Im Falle von $A\alpha$ und $B\beta$ spricht für einen N-terminalen Abbau durch LE die weitere Spaltbarkeit des Plasmin-induzierten Fragmentes E mit Elastase, welches den N-terminalen, dimeren Kern des Fibrinogen-Moleküls bzw. des Fibrin-Moleküls (nach Abspaltung eines β -Ketten-Polypeptides vom N-Terminus her) darstellt³⁰. Zum anderen wird der Verlust der Gerinnbarkeit früher hochmolekularer FSP_{LE} erklärlich, wenn es zur

N-terminalen Abspaltung von Polypeptiden der A α - und B β -Kette kommt, in denen Fibrinopeptid A (FPA) und FPB enthalten sind.²¹ Das bedeutet, daß Thrombin nicht mehr die Abspaltung eines oder beider Fibrinopeptide bewirken kann, so daß die für die Polymerisation offenbar geeignete räumliche Struktur des Moleküls nicht entstehen kann³⁰. Diese Annahme wird erhärtet durch folgenden Versuch von Bilezikian und Nossel mit Leukozyten-Protease²⁴ :

Dialysate von Protease-induzierten Fibrinogen-Abbauprodukten zeigen (in einem X_{LE}-analogen Abbaustadium) kaum immunologische Reaktion mit FPA oder FPB. Nach Behandlung des Dialysates mit Thrombin steigt die Immunreaktion jedoch signifikant an (bei FPA ca. 100-fach), woraus geschlossen wird, daß Thrombin die Fibrinopeptide aus den Polypeptiden herauspaltet. Die Antiseren reagieren nur mit FPA bzw. FPB im Dialysat, nicht dagegen mit größeren Peptiden.

Für die A α -Kette bedeutet dieses Ergebnis, daß das N-terminal abgespaltene Fragment mindestens die ersten 16 Aminosäuren vollständig enthält, da diese die Determinanten für Thrombin besitzen. Ferner geht daraus hervor, daß LE nicht wie Thrombin zwischen Arginin und Glycin (A 16-17) spaltet³⁰. Das Fehlen von A α -Ketten-Fragmenten im LE-Abbau in unseren Versuchen analog zum Plasmin-Abbau beruht somit möglicherweise auf der höheren Anzahl N-terminaler Spaltstellen für LE.

Was die B β -Kette betrifft, so muß ein Fragment N-terminal abgespalten werden, welches größer ist als FPB, dessen MG jedoch kleiner als ca. 6.000 ist, da es dialysierbar ist²⁴. Die Abspaltung eines Kettenbruchstückes dieser Größe beim Abbau der B β -Kette (56.000) zu B'_{LE} (ca. 50.000) in unseren Versuchen ist damit vereinbar.

Es zeigt sich also auch hier, daß sich diese Leukozyten-Proteasen, und mit ihnen vermutlich ihre stärkste Komponente²⁴, die LE, in ihrer Spaltspezifität von Thrombin, Thrypsin und Plasmin unterscheiden²⁴. Während Plasmin größtenteils Arginin- und Lysin-Bindungen spaltet, besitzt LE offenbar breitere Spaltspezifität, wobei Alanin-Valin-Bindungen (in einem synthetischen Substrat) bevorzugt gespalten werden³⁵. Mehr Aufschluß darüber könnte eine Endgruppenbestimmung der LE-induzierten Fibrin(ogen)-Spaltprodukte geben.

2.4. Hochmolekularen Abbauprodukten von Fibrinogen durch LE kommt, wie in einigen Arbeiten gezeigt wurde^{19,22,23}, möglicherweise eine starke gerinnungshemmende Wirkung auf Fibrinogen zu. Vermutlich bedingt durch eine ungünstige Wahl der Konzentrationsverhältnisse von FSP_{LE} , Fibrinogen und Thrombin konnten wir diesen Effekt in unseren Versuchen nicht eindeutig nachweisen. Die FSP_{LE} , welche maximale Anticlotting-Aktivität zeigen, lassen sich wie nach Elektrophorese sichtbar, nur mit hochmolekularen, frühen Spaltprodukten korrelieren (vergleichbar mit X_{LE}) und sind auch selbst nicht mehr gerinnbar. Diese Antithrombin-Aktivität ist vereinbar mit der Bildung löslicher Komplexe von frühen FSP_{LE} mit durch Thrombin entstandenen Fibrinmonomeren ($LFMK$)³⁴. Plasmin-induzierte FSP zeigen erst in einem späteren Abbaustadium diese Eigenschaft: Fragment Y zeigt hier maximale Anticlotting-Aktivität, was vermutlich sowohl auf einer kompetitiven Hemmung der Thrombin-katalysierten FPA-Abspaltung von Y bzw. Fibrinogen beruht, als auch durch eine Hemmung der Polymerisation von Fibrin-Monomeren bedingt ist. Für die gerinnungshemmende Wirkung der FSP_{LE} durch beide Mechanismen liegen Befunde vor^{19,24,25}, jedoch erscheint eine Hemmung der Polymerisation ausschlaggebend zu sein, da, wie unter 2.3. beschrieben, vermutlich bereits FPA und FPB innerhalb größerer Polypeptide abgespalten sind.

Auch kommt dem, in frühen FSP_{LE} zunächst erhaltenen, C-terminalen Anteil der χ -Kette, sowie den 43 N-terminalen Aminosäuren der β -Kette, welche durch LE (wie durch Plasmin bei der Entstehung von Fragment Y) schon früh abgespalten werden, besondere Bedeutung für die Polymerisation zu³⁰. Damit könnten FSP_{LE}-Moleküle zwar an ihren beiden χ -Ketten jeweils den intakten N-Terminus von Fibrinmonomeren binden, diese ihrerseits könnten jedoch keine weiteren FSP_{LE} mit defektem N-Terminus an ihre χ -Ketten anlagern. Die Polymerisation ist damit unterbrochen.

2.5. Die Spaltspezifität der LE am Fibrin(ogen), welche sich in unseren Versuchen deutlich von der des Plasmins unterscheidet, macht eine Aktivierung von Plasmin durch Leukozyten-Elastase als ausschlaggebenden Mechanismus ihrer fibrinolytischen Wirkung unwahrscheinlich. In Übereinstimmung mit neueren Arbeiten^{19,24} spricht die schwache Hemmwirkung, die wir mit den Plasmin(ogen)-Inhibitoren Trasylol und EACA auf LE erzielten, für eine weitgehend von Plasmin unabhängige Fibrinolyse-Aktivität der Elastase. Kopeč et al.²⁵ stellten sogar eine Inaktivierung von Plasminogen durch leukozytäre Elastase bei der Lösung von Fibrin-Gerinnseln fest.

3. Klinische Aspekte

Die hohe Syntheserate der menschlichen Leukozyten-Elastase von 1 g pro Tag^{zit. 15} läßt auf eine große Bedeutung u.a. in der Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung schließen. Während die LE unter physiologischen Bedingungen offenbar zur intrazellulären Proteolyse von Fibrin und anderen Partikeln befähigt ist, kann es unter pathologischen Bedingungen zur 1. lokalen oder 2. generalisierten extrazellulären Fibrinolyse durch LE kommen²:

3.1. Leukozyten sind offenbar befähigt, aktiv in frische und ältere Thromben einzuwandern, um dort lokal ihre Proteasen freizusetzen¹⁸. Retrahierte Thromben enthalten zudem nur Spuren von Plasminogen³⁶, so daß die Leukozyten-Elastase möglicherweise bei der Thrombolyse von großer Bedeutung ist. LE ist, wie wir in vitro zeigen konnten, in der Lage, Gerinnsel aus quervernetztem Fibrin zu lösen. Dabei entstehen Fragmente, deren MG unter 20-30.000 liegt und die damit vermutlich leichter eliminiert werden können als Doppel-D, das Endprodukt des XL-Fibrinabbaus durch Plasmin mit einem MG von ca. 170.000. Möglicherweise ergänzt LE auf diese Weise die thrombolytische Wirkung von Plasmin durch weiteren Abbau seiner Endprodukte.

3.2. PMN-Proteasen spielen ferner möglicherweise in der Pathogenese der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) eine wichtige Rolle^{rev. 37}: die Gabe von nur einer Endotoxin-Injektion löst bei leukopenischen Kaninchen in Kombination mit einer Infusion des Überstandes von PMN-Granula bereits massive intravaskuläre Gerinnung mit glomerulärer Mikrothrombosierung aus. Dies wird durch eine mögliche Interaktion von (u.a.) lysosomalen kationischen Proteinen von PMNs mit löslichen Fibrinmonomer-Komplexen als Voraussetzung für das Ausfallen von Fibrin begründet. Weitere Untersuchungen konnten diese Annahme bestätigen und zeigten, daß PMNs offenbar an der Aktivierung der DIC über die Bildung von LFMK ursächlich beteiligt sind, nicht dagegen an der folgenden Präzipitation von Fibrin, die durch weitere Endotoxinwirkung vermutlich unabhängig von Thrombin bewirkt werden kann³⁸. Die in unseren Versuchen früh aufgehobene Gerinnbarkeit hochmolekularer, durch Leukozyten-Elastase entstandener Fibrinogen-Spaltprodukte sowie deren möglicher gerinnungshemmender

Effekt sprechen für eine derartige Wirkung der LE. Im Unterschied zu Plasmin entsteht durch LE der Zustand der Hyperkoagulabilität möglicherweise durch wesentlich geringere Enzymwirkung.

Neben einer Komplexierung von FSP_{LE} mit Fibrinmonomeren ist unter Umständen auch noch ein weiterer Mechanismus der Elastase-Wirkung bei der Entstehung der DIC beteiligt:

Kälteunlösliches Globulin, CIG (identisch mit Fibronektin bzw. α_2 -Oberflächenprotein³⁹) besitzt offenbar eine Schlüsselfunktion bei der Phagozytose und Elimination von Bakterien, Immunkomplexen, Fibrin-Microaggregaten etc.

im Reticuloendothelialen System (RES)⁴⁰. Möglicherweise resultiert aus der Proteolyse von CIG, wie wir sie in unseren Versuchen mit LE in vitro zeigen konnten (s. Kap. C,6), eine "Blockade" des RES, so daß die zur Elimination bestimmten Partikel länger in der Zirkulation pathogen bleiben und so die Bildung von Mikrothromben und deren klinische Folgen bewirken können³⁷. So verbesserte sich der Zustand von Patienten mit chirurgischem Trauma oder Sepsis, bei denen ein Mangel an CIG und begleitende RES-Depression vorhanden war, durch die intravenöse Infusion von CIG-enthaltendem Kryopräzipitat erheblich und verbesserte ihre Überlebenschance im septischen Schock⁴⁰.

Die mit der disseminierten intravaskulären Gerinnung einhergehende Blutungsneigung hat vermutlich nicht ihre einzige Ursache im Verbrauch von Gerinnungsfaktoren: LE ist offenbar in der Lage, Gerinnungsfaktoren auch direkt abzubauen^{9,43}. Hierbei ist der in vitro-Abbau der beiden Untereinheiten von Faktor XIII, A und S, durch LE von besonderem Interesse, da bei normaler Gerinnung nur F XIII A verbraucht wird. In vivo-Versuche mit Affen,

denen Leukozyten-Elastase injiziert worden war, bestätigten die Proteolyse von Faktoren. Auch zeigten Affen nach Endotoxin-Injektion neben ähnlichen Gerinnungsstörungen einen erhöhten α_1 -Antitrypsin-Spiegel (Transport der LE), wie er ebenso in Patienten mit akuter Leukämie und Sepsis bei gleichzeitiger Erniedrigung von α_2 -Markoglobulin (Elimination der LE) gefunden wird^{9,41,42,43}.

Die Endotoxin-induzierte Granulozytopenie sowie die reaktive Granulozytose, welche sich durch einen hohen Anteil unreifer Vorstufen mit Vermehrung an azurophilen Granula auszeichnet, aus denen die LE isoliert wurde, sind weiter deutliche Hinweise auf die möglicherweise bedeutende Rolle der Leukozyten-Elastase bei der Entstehung der DIC³⁷.

Diagnostisch kann eine Beteiligung der LE an Gerinnungsstörungen in vivo bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, da ihre Fibrin(ogen)-Spaltprodukte elektrophoretisch und immunologische Ähnlichkeiten besitzen mit den Plasmin-induzierten Spaltprodukten^{19,21}. Ein spezifischer immunologischer Nachweis etwa eines frühen α -Ketten-Fragments (analog zum Nachweis des Fibrinopeptides A für eine Thrombin-Wirkung⁴⁴) könnte daher von hohem klinischen Nutzen sein.

Für eine Therapie der proteolytischen LE-Wirkung werden derzeit die Möglichkeiten mit verschiedenen Inhibitoren untersucht. In der möglichen Verhinderung der LE-induzierten Blutungsneigung beim septischen Schock könnte ein zusätzlicher Vorteil einer Hemmung der Elastase gesehen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aufbauend auf frühere Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit die proteolytische Wirkung hochgereinigter Leukozyten-Elastase (LE) auf quervernetztes Fibrin untersucht. Ihre Spaltspezifität konnte anhand ihrer Abbauwirkung auf Fibrinogen mit Hilfe der SDS-Polyacrylgel-Elektrophorese genauer als bisher charakterisiert werden.

LE spaltet Fibrinogen und quervernetztes Fibrin an wesentlich mehr Stellen als Plasmin. Der Abbau verläuft deshalb durch LE kontinuierlicher über mehr Zwischenstufen und führt zu kleineren Endprodukten. Die Endprodukte des Plasminabbaues in Gegenwart von Calcium, die Fragmente D und E aus Fibrinogen bzw. Doppel-D und E aus quervernetztem Fibrin, werden durch LE in analoger Weise weiter abgebaut. Daher tritt auch das als Marker für intravaskuläre Gerinnung charakteristische Fragment Doppel-D nur vorübergehend auf und stellt kein stabiles Endprodukt dar. Der Weiterabbau durch LE ist Folge eines weitergehenden Abbaues der γ -Kette, der auch trotz Quervernetzung durch Faktor XIII stattfindet. Auch der Abbau der β -Kette verläuft durch Plasmin und LE in unterschiedlicher Weise: während das Fragment β' durch Plasmin lediglich beim Abbau von Fibrinogen vorübergehend entsteht, tritt β' durch LE auch beim Abbau von Fibrin in Erscheinung, bevor es ebenfalls zu β'' abgebaut wird.

Die α -Kette wird durch LE zu kleinen Fragmenten abgebaut, welche elektrophoretisch nur schwer faßbar sind.

Der Verlust der Gerinnbarkeit früher hochmolekularer Fibrinogen-Spaltprodukte sowie das Fehlen von Fragment E konnten mit der N-terminalen Spaltung aller drei Ketten des Fibrinogens durch LE erklärt werden.

Für die Pathophysiologie ergibt sich aus unseren Befunden eine möglicherweise bedeutende Rolle der Leukozyten-Elastase bei der lokalen Thrombolyse sowie bei der Entstehung der disseminierten intravaskulären Gerinnung.

LITERATUR

- A. Havemann, K., Janoff, A. (Hrsg.)
Neutral proteases of human polymorphnuclear leucocytes.
Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 1978
- B. Davidson, J.F., Rowan, R.M., Samama, M.M., Desnoyers, P.C.
(Eds.)
Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis
Vol. 3, 1978
- 1. Baggiolini, M., Bretz, U., Dewald, B.
Subcellular localization of granulocyte enzymes
A: 3-17 1978
- 2. Smolen, J.E., Weissmann, G.
The granulocyte: metabolic properties and mechanism of
lysosomal enzyme release.
A: 56-77, 1978
- 3. Janoff, A., Feinstein, G.
Granulocyte elastase: isolation and characterization.
A: 102-113, 1978
- 4. Ohlsson, K.
Purification and properties of granulocyte collagenase
and elastase
A: 89-101, 1978
- 5. Baugh, R.J., Travis, J.
Human leukocyte granule elastase: Rapid isolation and
characterization
Biochemistry, Vol. 15/4: 836-841, 1976
- 6. Olsson, I., Odeberg, H., Weiss, J., Elsbach, P.
Bactericidal cationic proteins of human granulocytes
A: 18-32, 1978
- 7. Schmidt, W. and Havemann, K.
Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like neutral
proteases from human granulocytes
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 355, 1974, 1077
- 8. Prokopowicz, J.
Distribution of fibrinolytic and proteolytic enzymes in
subcellular fractions of human granulocytes
Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 1968, 84

9. Egbring, R., Schmidt, W., Fuchs, G. Havemann, K.
Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septikemia with coagulation defects.
Blood, Vol. 49, 2, 1977
10. Blondin, Y., Janoff, A., Powers, J.C.
Digestion of E. coli proteins by human neutrophil elastase and chymotrypsin-like enzyme (cathepsin G): Experiments with a cell-free system and living leukocytes, 1978, A: 39-56
11. Riddle, J.M. and Barnhart, M.I.
Ultrastructural studies of fibrin dissolution via emigrated polymorphnuclear neutrophiles
Am. J. Pathol. 45, 1964, 805
12. Spitznagel, J.K.
Intracellular and extracellular degranulation of human polymorphnuclear azurophilic and specific granules induced by immun complexes
A: 83-85, 1978
13. Ohlsson, K., Olsson, I.
The extracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory processes.
Scand. J. Haemat. 19, 1977, 145-152
14. Ohlsson, K.
Interaction of granulocyte neutral proteases with α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin and α_1 -antichymotrypsin
A: 167-177
15. Schiessler, H., Hochstrasser, K., Ohlsson, K.
Acid-stable inhibitors of granulocyte neutral proteases in human mucous secretions: biochemistry and possible biological function.
A: 195-207, 1978
16. Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S., Werle, E.
Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1972, 1865-1877
17. Janoff, A., Blondin, J., Sandhaus, R.A., Mosser, A., Malemud, C.
Human neutrophil elastase: In vitro effects on natural substrates suggest important physiological and pathological actions.
B: 603-620, 1975

18. Henry, R.L.
Leukocytes and thrombosis
Thromb. Diath. Haemorrh. 13, 1965, 35
19. Plow, E.F., Edgington, T.S.
An alternative pathway of fibrinolysis.
I. The cleavage of fibrinogen by leucocyte proteases at physiologic pH.
J. Clin. Invest. 56, 1975, 30-38
20. Schmidt, W., Egbring, R., Havemann, K.
Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors.
Thromb. Res. 6, 1975, 315-326
21. Bicezikian, S.B., Nossel, H.L.
Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leukocyte proteases.
Blood 50, 1977, 21-28
22. Gramse M., Bingenheimer, C., Schmidt, W., Egbring, R., Havemann, K.
Degradation products of fibrinogen by elastase-like neutral protease from human granulocytes
J. Clin. Invest. 61, 1978, 1027-1033
23. Kopeč, M., Wegrzynowicz, Z., Ardelt, W., Teisseyre, E., Latallo, Z.S.
Effect of elastolytic enzymes from human leucocyte granules and from pig pancreas on plasminogen, fibrinogen, and fibrin
Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis 3, 1978, 417-425
24. Plow, E.F., Edgington, T.S.
The fibrinolytic pathway of leucocytes
A: 330-344, 1978
25. Weber, K., Osborn, M.
Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. The proteins, 3rd Edition, Vol 1, Ed. Neurath, Hill, Boeder, Academic Press N.Y., S.F., London, 1973
26. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, A.P.
The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen
J. Biol. Chem. Vol. 247, 3, 1972, 636-645

27. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, A.P.
The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin
J. Biol. Chem. Vol. 248, 13, 1973, 4574-4583
28. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, A.P.
Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-linked Fibrin
J. Biol. Chem. Vol. 248, 1973, 4584-4590
29. Haverkate, F. Timan, G.
Protective effect of calcium in the plasmin degradation of fibrinogen and fibrin fragments
D. Thromb. Res. 10, 1977, 803
30. Blombäck, B.
Fibrinogen and fibrin formation
In: Fibrinolytics and antifibrinolytics. Hrsg. Markwadt, F.
1978, 48-79
31. Graeff, H., von Hugo, R., Hafter, R.
The evaluation of hypercoagulability and DIC by quantitative gel filtration and by chain analysis of isolated soluble fibrin monomer complexes (SFMC)
Vth Int. Congr. ISTH, Paris, Juli 1975, Abstr. Vol. 138
32. Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.P., Fritz, H.
Isolation and characterization of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1977, 1105-1117
33. Schiessler, H., Ohlsson, K., Olsson, I., Arnhold, M.
Birk, Y., Fritz, H.
Elastases from human granulocytes, II. Interaction with protease inhibitors of animal, plant, and microbial origin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1977, 53-68
34. Kopeč, M., Latallo, Z.S.
Fibrinogen and fibrin degradation products.
In: Fibrinolytics and antifibrinolytics. Hrs. Markwardt, F.
1978, 80-105
35. Zimmermann, M., Ashe, B.M.
Substrate specificity of the elastase and the chymotrypsin-like enzyme of the human granulocyte
Acta Biochem. Biophys. 480, 1977, 241-245
36. Gottlob, R., Mattausch, M., Porschinski, K., Kramar, R.
The possible role of leukocytes in spontaneous and induced thrombolysis and some properties of leukocyte protease.
B. 1978, 391-411

37. Horn, R.G.
Evidence for participation of granulocytes in the pathogenesis of generalized Shwartzman reaction: a review. J. of infectious Disease 128, 1973, 134-143
38. Müller-Berghaus G., Eckhardt
The role of granulocytes in the activation of intravascular coagulation and the precipitation of soluble fibrin by endotoxin. Blood 45, 1975, 631
39. Vaheri, A., Ruoslahti, E.
Fibroblast surface antigen molecules and their loss from virus-transformed cells: A major alteration in cell surface. B: 967-975,
40. Saba, T.M.
Cryoprecipitate reversal of opsonic α_2 -surface binding glycoprotein deficiency in septic surgical and trauma patients. Science, Vol. 201, 1978, 622-624
41. Egbring, R., Havemann, K.
Possible role of polymorphonuclear granulocyte proteases in blood coagulation A: 442-455
42. Witte, J., Schiessler, H., Scherer, R., Jochum, M., Schramm, W., Fritz, H.
Hyperdynamer septischer Schock des Menschen: Konzentrationsverlauf von ausgewählten Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteinen. - Chirurg. Forum 79 für experiment. und klin. Forschung Hrsg. H. Junghans, Springer, Berlin-Heidelberg, 1979, S. 55
43. Schießler, H., Jochum, M., Witte, J., Kaplan, O.
Effect of a protease-inhibitor on the concentration of some clotting and other plasma-factors in the course of gram-negative sepsis and experimental endotoxinaemia. Int. Meeting Inflammation, Sept. 79
44. Nossel, H.L., Butler, V.P., Canfield, R.E., Yudelmann, I., Spanodis, K., Soland, T.
Potential use of fibrinopeptide A measurement in the diagnosis and management of thrombosis. Thromb. Diath. haemorrh. 33, 1975, 426-434

LEBENS LAUF

Geburtstag: 9. März 1952

Geburtsort: München

Eltern: Dr. Viktor Lieb, Chemiker,
Ursula Traun-Lieb, Schauspielerin

Verheiratet mit: Dr. Wolf-Eberhard Petri, Physiker

Sohn: Nicolaus, geb. am 9.12.1978

Schul Ausbildung: 1958 - 1971 Rudolf Steiner-Schule in München
1971 externes Abitur am Oskar von Miller-
Gymnasium in München

Medizinstudium: 1971 - 1974 Vorklinische Semester an der
Ludwig-Maximilians-Universität in
München
1974 - 1977 Klinische Semester an der Albert
Ludwig-Universität in Freiburg
1977 - 1978 Beendigung des klinischen Studien-
abschnitts an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

Naturwissenschaft-
liche Vorprüfung: März 1973 in München

Ärztl. Vorprüfung: März 1974 in München

Famulaturen und
freiwillige Praktika: Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. med. H. Dorschel
Praxis für Chirurgie und Unfallchirurgie,
Dr. med. J. Groetz
Praxis für Pädiatrie, Dr. med. Meincken
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Abteilung
für Innere Medizin, Prof. Dr. med. E. Hiller
Children's Health Center, San Diego/California
Distrikt-Hospital, Nouna/Obervolta/Westafrika
Kreiskrankenhaus Starnberg, Abteilung für Innere
Medizin, Prof. Dr. med. H. Lydtin

Praktisches Jahr: Chirurgie: Städtisches Krankenhaus Landshut,
Prof. Hueck
Gynäkologie: I. Frauenklinik der Universität
München, Prof. Dr. med. J. Zander
Innere Medizin: Medizinische Klinik Innenstadt,
Universität München, Prof. Dr. med. Buchborn

Ärztliche Prüfung: April 1978 (3. Abschnitt) in München

ECFMG: Juli 1978

Dissertation: seit Mai 1978 an der I. Frauenklinik der
Universität München bei Prof. Dr. H. Graeff

Für die freundliche und wertvolle Unterstützung danke
ich Herrn Prof. Dr. med. H. Graeff.

Für die Anleitung zum experimentellen Arbeiten und die
Hilfe bei Fragen und Problemen danke ich Herrn Dr. rer.nat.
R. Hafter.

Für die Überlassung des Enzyms danke ich Herrn Dr. rer.nat.
H. Schießler.

Für die freundliche Hilfe bei den Laborarbeiten danke ich
Fräulein B. von Brunn.

Für die rasche Erledigung der Schreibarbeiten danke ich
Frau D. Spindler.

